

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR THERAPIE VON HAUTKARZINOMEN
NACH TUMORSELEKTIVER PHOTOSENSIBILISIERUNG
MIT HÄMATOPORPHYRIN-DERIVAT(HpD)

-Einfluss der Bestrahlungsparameter-

Manfred Schröder

*Diss
München
1985*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. O. Braun-Falco

Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Therapie von Hautkarzinomen
nach tumorselektiver Photosensibilisierung
mit Hämatoporphyrin-Derivat (HpD)
— Einfluß der Bestrahlungsparameter —

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manfred Schröder
aus
Kassel

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	P. D. Dr. med. M. Landthaler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. O. Braun-Falco
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	3. 10. 1985

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. O. Braun-Falco für die Überlassung dieser Arbeit sowie für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Apparaturen;

Herrn P. D. Dr. med. M. Landthaler und Herrn Dr. med. R. Brunner, mit denen in enger Zusammenarbeit diese Arbeit entstand;

Herrn Dr. rer. nat. D. Haina, der mich bei meiner Arbeit an den Laserapparaturen tatkräftig unterstützte und mir viele wichtige Anregungen gab;

Herrn Dr. med. J. Kummermehr für die Überlassung der Versuchstiere und die Beratung in allen Fragen, die das Tumormodell betrafen;

Herrn Dr. med. D. Jocham und Herrn Dr. rer. nat. E. Unsöld für das zur Verfügung gestellte HpD und die Weitergabe ihrer Erfahrungen mit dieser Substanz;

Herrn Dr. med. Chr. Götz für die sachkundige Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung des Datenmaterials;

Frau M. Neuner und Frau H. Pfeiffer für die Einarbeitung in die praktische Arbeit mit den Versuchstieren

und ganz besonders meiner Freundin Sabine Kubalek, die durch Korrekturarbeiten und viele kritische Anmerkungen half, die Arbeit in die entgeltliche Form zu bringen.

MEINEN ELTERN

1	EINLEITUNG.....	1
	Historischer Überblick.....	4
2	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	Hämatoporphyrin-Derivat (HpD).....	7
2.1.1	Fluoreszenz.....	7
2.1.2	Selektive Anreicherung von HpD.....	10
2.1.3	Photosensibilisierung von Gewebe durch HpD.....	11
2.2	Versuchstiere.....	14
2.3	Tumor.....	14
2.3.1	Histologie.....	14
2.3.2	Autoradiographische Untersuchung des Tumors.....	16
2.4	Techniken zur Tumoringuktion.....	18
2.4.1	Auswahl des Spenders.....	18
2.4.2	Exstirpation des Spendertumors, Vorbereitung der Trans- plantate.....	18
2.4.3	Vorbereitung der Empfängertiere.....	19
2.4.4	Narkose.....	19
2.4.5	Transplantation.....	20
2.4.6	Tumoringuktion von intracutanen Tumoren.....	21
2.5	Kennzeichnung der Versuchstiere.....	21
2.6	Messung der Tumormasse in vivo.....	22
2.7	Auswahl der Versuchstiere für die Behandlung.....	23
2.8	Injektion von HpD.....	24
2.9	Versuchsanordnung für die Lichtbehandlung.....	25
2.9.1	Laser.....	27
2.9.2	Modifikation des Lichtstrahles.....	27
2.9.3	Rotlampe.....	29
2.9.4	Halteapparat für das Versuchstier.....	30
2.9.5	Bestimmung der Leistungsdichte und Dosis.....	32

2.9.6	Wahl der geeigneten Lichtdosis.....	33
2.9.7	Bestrahlungszeit.....	33
2.9.8	Messung der Temperatur im Tumor unter Behandlung.....	34
2.10	Versuchsauswertung.....	35
2.10.1	Erstellung von Wachstumskurven.....	35
2.10.2	Growth Time, Regrowth Time und Growth Delay.....	36
2.10.3	Statistische Auswertung.....	37
2.10.3.1	Beurteilung der Verteilung der Messwerte.....	39
2.10.3.2	Regressionsanalyse.....	39
2.10.3.3	Statistische Auswertung der Wirksamkeit einer Behandlung.....	43
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	Bestimmung der geeigneten Lichtdosis.....	47
3.2	Behandlung mit der Rotlampe.....	50
3.3	Einfluß der Leistungsdichte des Rotlichtes auf das Tumorstadium ohne Photosensibilisierung.....	52
3.4	Ergebnisse der Temperaturmessung im Tumor.....	55
3.5	Photodestruierende Effekte von HpD bei Verwendung von Licht unterschiedlicher Leistungsdichten.....	63
3.5.1	Ergebnisse zur Untersuchung der Verteilung der Meßwerte.....	63
3.5.2	Ergebnisse der Regressionsanalyse.....	66
3.5.3	Ergebnisse zur Wirksamkeit unterschiedlicher Leistungsdichten in der Photochemotherapie mit HpD.....	67
3.6	Untersuchung der Nebenwirkungen der Photochemo- therapie mit HpD an der Haut.....	81
4	DISKUSSION.....	87
4.1	Aus der Literatur entnommene Behandlungsparameter.....	88
4.2	Beurteilung der in der statistischen Auswertung verwendeten Daten.....	90

4.3	Die Bedeutung der Leistungsdichte in der Photo- chemotherapie mit HpD.....	92
4.4	Die Bedeutung des Temperaturanstiegs im Tumor unter Behandlung.....	95
4.5	Nebenwirkungen der Photochemotherapie mit HpD.....	98
4.6	Perspektiven der Photochemotherapie mit HpD.....	99
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
6	ANHANG.....	105
6.1	Techniken zur Autoradiographie.....	105
6.2	Techniken zur Tumorinduktion mittels einer Zell- suspension.....	107
6.3	Ergebnistabellen statistischer Berechnungen.....	110
7	LITERATUR.....	143
	LEBENS LAUF.....	163

1 EINLEITUNG

Für viele bösartige Neoplasien der Haut ist die operative Entfernung im Gesunden die sicherste und praktikabelste Form der Behandlung. Einige Hautmalignome sind operativ jedoch nicht befriedigend zu therapieren. Dies gilt zum Beispiel für gewisse Tumoren in problematischer Lokalisation, (wie am Augenlid) sowie für bestimmte Lymphome der Haut, (z. B. die Mycosis fungoides), aber auch für multiple Hautmetastasen von Tumoren unterschiedlicher Herkunft. Für solche Erkrankungen besteht auch heute noch in der Dermatologie ein Bedarf an verbesserten Therapieformen - es befinden sich daher eine Vielzahl neuer Behandlungsmethoden in intensiver Erprobung.

Die Photochemotherapie mit Hämatoporphyrin-Derivat (Photoradiation therapy, PRT) wurde in den USA bei etwa 3000 Patienten bisher angewandt. Die therapeutischen Möglichkeiten die man sich von dieser neuartigen Therapieform erhofft, hängen mit den besonderen Eigenschaften der verwendeten Substanz, dem Hämatoporphyrin-Derivat (HpD), zusammen.

Wie zahlreiche Porphyrine, aber auch andere Substanzen, wie z. B. Tetracycline, bewirkt HpD eine Photosensibilisierung des Gewebes, welches diese Substanz speichert^{29, 33, 38}. Bei geeigneten Versuchsbedingungen ist HpD in der Lage, schwerste phototoxische Reaktionen in solchen Geweben hervorzurufen. Hinzu kommt eine zweite bedeutende Eigenschaft der Substanz - HpD wird selektiv in einer Vielzahl von Tumoren angereichert^{16, 90, 135}.

Damit ist HpD ein "tumorselektiver Photosensibilisator"⁷⁶. Der therapeutische Aspekt liegt auf der Hand: Bei Bestrahlung der HpD-speichernden Tumoren mit Licht werden diese zerstört, das tumorfreie nicht HpD-speichernde Gewebe der Umgebung wird geschont.

Eine diagnostische Anwendungsmöglichkeit von HpD weckt zusätzliches Interesse an dieser Substanz. Bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert sie mit rotem Licht. Auch kleinste okkulte Herde HpD-spei-

chernden, tumorösen Gewebes können dadurch als solche erkannt werden^{26, 91, 95, 99-102, 117}.

Wird ein HpD-speichernder Organismus vor Licht geschützt, so wurden bisher nur wenige und geringfügige Nebenwirkungen der Substanz festgestellt; kanzerogene Veränderungen sind noch nicht beobachtet worden^{10, 86}.

Obwohl die Herstellung von HpD seit etwa 25 Jahren möglich ist^{97,98}, werden erst seit kurzem Versuche zu seiner Anwendbarkeit in der Tumorthherapie angestellt. Der Grund hierfür liegt hauptsächlich darin, daß es lange Zeit nicht gelang, den zu behandelten Tumoren genügend Lichtenergie zuzuführen, um eine zytotoxische Reaktion auszulösen. Durch Einführung energiestarker Farbstofflasersysteme in der Medizin wurde auch dieses Problem in jüngster Zeit gelöst.

Bis heute wurde in den verschiedenen medizinischen Fachrichtungen die Photochemotherapie mit HpD angewendet, wenn andere therapeutische Möglichkeiten ausgeschöpft waren. So wurden beispielsweise Karzinome des Bronchialsystems^{27, 50}, Blasenkarzinome⁸⁵ sowie verschiedene Tumoren und Metastasen in der Haut^{39, 41, 147} mit HpD und Licht behandelt. Trotz zweifelsfrei vielversprechenden Erfolgen in einigen Bereichen steht eine allgemeine, systematische Grundlagenforschung für die Photochemotherapie mit HpD noch aus.

Aus diesem Grund soll diese Arbeit die Klärung einiger Grundlagenprobleme zum Ziel haben. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, ob die Größe der Leistungsdichte des in der Photochemotherapie mit HpD verwendeten Lichtes einen Einfluß auf die Wirksamkeit der Behandlung hat. Dies wird an einem dermatologischen Tumormodell (entdifferenziertes spinözelluläres Karzinom der Maus) untersucht; Erfahrungen über die Eignung des Tumormodells sowie über die Praktikabilität der Photochemotherapie mit HpD und deren Nebenwirkungen werden erläutert. Die Literatur zu diesem Thema soll in einigen wichtigen Punkten dabei diskutiert werden.

Historischer Überblick

- 1900 V. TAPPEINER und RAAB berichten von der schädigenden Wirkung verschiedener fluoreszierender Stoffe (Akridin, Eosin, Chinin) auf Paramaecien (Pantoffeltierchen), die nur bei gleichzeitiger Anwendung von Licht beobachtet werden kann^{118, 133}.
- 1903 V. TAPPEINER und JESIONEK therapieren Hautkarzinome, Fälle von Ulcus rodens und Lupus vulgaris durch lokale Applikation von Eosin und anschließender Sonnenlichtexposition¹³⁴.
- 1911 HAUSMANN beschreibt erstmals phototoxische Effekte ("photo-dynamic action") nach Gabe von Porphyrinen bei Säugetieren^{12, 70}.
- 1913 MEYER-BETZ weist diese Effekte in einem Selbstversuch nach^{12, 106}.
- 1924 POLICARD erkennt die selektive Anreicherung endogener Porphyrine in menschlichen Tumoren anhand ihrer spontanen Fluoreszenz im UV-Licht (Wood-Lampe)¹³⁵.
- 1942 AULER und BANZER geben tumortragenden Ratten verschiedene Porphyrine. Sie weisen deren Anreicherung in tumorösen Geweben nach, die sich durch eine orange-rote Fluoreszenz im UV-Licht zeigt^{12, 135}.
- 1955 Hämatoporphyrin (Hp) liegt in gereinigter Form vor¹¹⁹. Aufgrund seiner bisherigen Verunreinigungen durch Phenole konnte es Menschen nur in kleinen Dosen verabreicht werden, die zur Erzielung einer Fluoreszenz von Tumoren nicht ausreichten¹³⁵.
- 1955 -60 Das Verfahren zur Herstellung von Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) wird entwickelt. Dieses ist dem Hämatoporphyrin durch seine wesentlich stärkere Anreicherung in tumorösen Geweben überlegen^{97, 123}.

- 1961 LIPSON et al. beschreiben die Fluoreszenz menschlicher Bronchial- und Ösophaguskarzinome im Licht einer gefilterten Bogenlampe nach Gabe von HpD. Damit wird HpD erstmalig am Menschen untersucht^{76, 98}.
- 1972 DIAMOND et al. gelingt es, durch Zusammenfassung der Erkenntnisse über die Phototoxizität von HpD sowie seine Anreicherung in Tumoren eine wirksame Therapie zu begründen. Er erzielt an Gliomazellen und transplantierten Gliomen in Ratten eine Schädigung der Tumoren durch HpD und weißes Licht (150 Watt)^{12, 29}.
- 1974 DOUGHERTY et al. versucht, mit dem weißen Licht einer Xenon-Lampe (1000 Watt) und HpD Plattenepithelkarzinome von Mäusen zu therapieren³⁴. Ein Großteil der Erkenntnisse der jüngsten Zeit auch zur klinischen Anwendbarkeit der Photochemotherapie mit HpD sind ihm zu verdanken.
- 1984 BRUCE therapiert intraokuläre Melanome mit HpD und Licht eines Dye-Lasers (630 nm)¹⁴.
- 1984 JOCHAM et al. setzen als erste in der Bundesrepublik Deutschland HpD zur Therapie des menschlichen Blasenkarzinoms ein^{77, 78, 129}.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Hämatoporphyrin-Derivat (HpD)

Als photosensibilisierende Substanz wurde in diesem Versuch das Hämatoporphyrin-Derivat Photophrin II^R verwendet.

Ausgangssubstanz zur Herstellung von HpD ist das Hämatoporphyrin (Hp), welches als metallfreies Abbauprodukt des Rinderhämoglobins entsteht. Bei der Bildung von Hp entstehen zumeist auch eine Reihe von Hp-Derivaten. Wie erst Lipson 1960 bewies, lagern sich vor allem diese Derivate selektiv im Tumorgewebe ein^{97, 98}. Durch Behandlung mit Essigsäure und Schwefelsäure und anschließender Reaktion mit einem basischen Medium gelang es ihm, aus Hämatoporphyrin Hämatoporphyrin-Derivat herzustellen.

HpD stellt also eine Mischsubstanz aus einer Vielzahl in ihrer Struktur z. T. noch unbekannter Porphyrine dar¹⁰⁹. Abb. 1 zeigt die Grundstruktur der Hämatoporphyrin-Derivate mit einigen ihrer bekannten Komponenten.

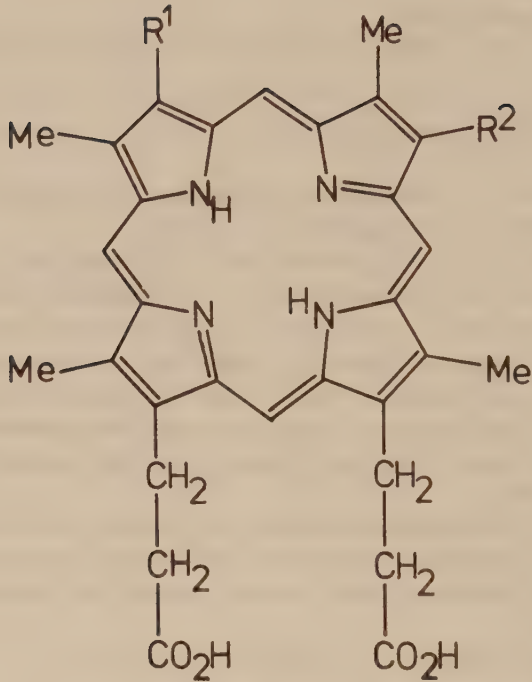
Die drei bedeutungsvollsten Eigenschaften des HpD sind:

- Fluoreszenz bei Anregung durch Licht
- Selektive Anreicherung in bestimmten Geweben
- Photosensibilisierung von Gewebe

Diese Eigenschaften sollen im folgenden kurz erläutert werden.

2.1.1 Fluoreszenz

Bestrahlt man HpD oder HpD-anreichernde Gewebe mit UV-Licht (405 nm), so läßt sich eine deutliche Fluoreszenz orange-roten Lichtes beobachten¹³⁹. Abb. 2 zeigt ein Emissionsspektrum der Fluoreszenz von HpD mit einem größeren Gipfel bei 615 - 630 nm und einem kleineren bei 580 - 590 nm⁶. Besonders die Fluoreszenz in den genannten Bereichen macht man sich in der Tumordiagnostik unter Verwendung von HpD nutzbar. Dabei können Tumoren unterschiedlichster Lokalisation und



1. $R^1 = R^2 = \text{CH(OH)Me}$
2. $R^1 = \text{CH(OH)Me}$; $R^2 = \text{CH(OAc)Me}$
3. $R^1 = \text{CH(OAc)Me}$; $R^2 = \text{CH(OH)Me}$
4. $R^1 = \text{CH(OH)Me}$; $R^2 = \text{CH=CH}_2$
5. $R^1 = \text{CH=CH}_2$; $R^2 = \text{CH(OH)Me}$
6. $R^1 = R^2 = \text{CH(OAc)Me}$
7. $R^1 = \text{CH(OAc)Me}$; $R^2 = \text{CH=CH}_2$
8. $R^1 = \text{CH=CH}$; $R^2 = \text{CH(OAc)Me}$
9. $R^1 = R^2 = \text{CH=CH}_2$

Abb. 1: Strukturformel von HpD mit einigen bekannten Komponenten (R^1 , R^2); Me = Methyl, ¹².

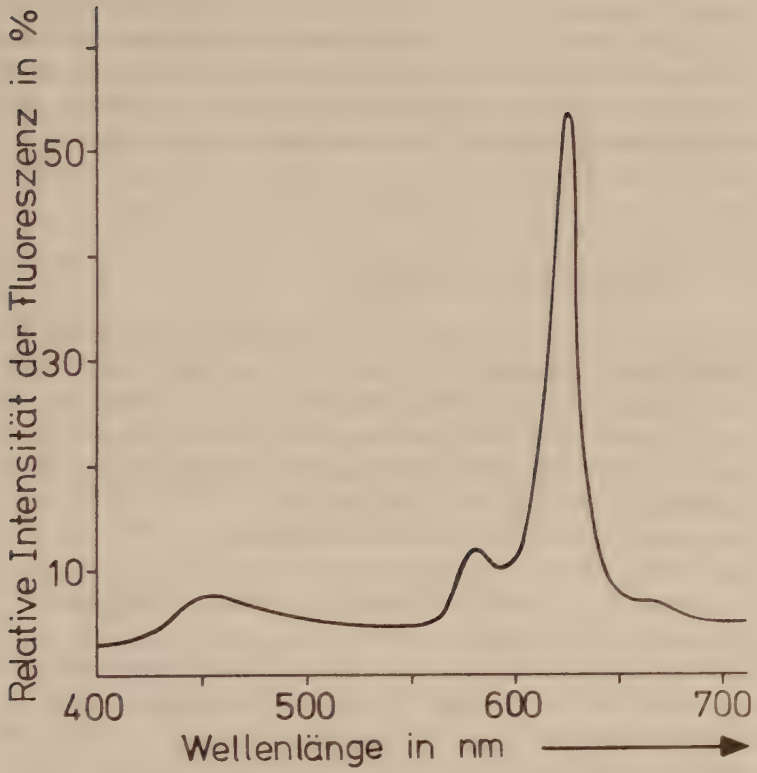


Abb. 2: Fluoreszenzemissionsspektrum von HpD, ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$)⁶.

Herkunft nach Gabe von HpD durch die Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden^{32, 65, 98}. Darüberhinaus beobachtet man eine Reihe von Fluoreszenzbereichen anderer Wellenlängen, jedoch mit geringerer Intensität. Der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz ist abhängig von der Wellenlänge des Lichtes, mit dem HpD angeregt wird. Für das Vorhandensein mehrere Fluoreszenzbereiche macht man die Tatsache verantwortlich, daß HpD aus einem Gemisch von Substanzen besteht.

2.1.2 Selektive Anreicherung von HpD

Die Anreicherung von HpD in bestimmten Geweben war Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen. Trotzdem ist dieses Phänomen nicht vollständig geklärt. Da vor allem die Maus als Versuchstier Verwendung fand, beziehen sich die folgenden Angaben auf Untersuchungen mit diesem Tier. Prinzipiell scheinen die gewonnenen Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus übertragbar zu sein^{21, 26, 38, 41, 84}. Sie bedürfen aber noch einer allgemeinen Bestätigung.

Man vermutet, daß HpD im Blut an Serumproteine gebunden ist. Einer intravenösen Gabe von HpD (bei der Maus i. p.) folgt daher eine gleichmäßige Verteilung der Substanz in fast allen Geweben. An die Membranen von Zellen soll sich HpD ebenfalls binden können. Durch den Kontakt von sich extravasal befindlichen Serumproteinen und Zellen kann sich deshalb HpD an Zellmembranen anlagern. Ein Fließgleichgewicht zwischen HpD an Proteinen und HpD an Zellen stellt sich ein. Durch die Halbwertszeit von HpD im Blut von nur 3 Stunden (Maus) wird aber der Einstellungswert des Fließgleichgewichts immer weiter auf niedrigere Werte verändert; HpD wird wieder ausgewaschen^{16,20,115}.

In bestimmten Geweben findet man Abweichungen im Austausch von intra- und extravasalen Serumproteinen. So kommt es z. B. bei erhöhter Gefäßpermeabilität und/oder verlangsamter Lymphdrainage zur Anreicherung von Serumproteinen im Interstitium. Dabei ist eine vermehrte Anlagerung von HpD in solchen Geweben möglich; zusätzlich haben diese Gewebe bei Abfällen des Serum-HpD-Spiegels eine langsamere Clearance (verzögerte Abgabe) von HpD¹⁶.

Gewebe mit vermehrten Serumproteinen im Interstitium sind u. a. Entzündungsherde, Gewebe in Wundheilung und tumoröses Gewebe, aber auch das retikuloendotheliale System (RES) in einer Reihe von Organen. Gibt man HpD, so findet sich nach gewisser Zeit eine relative Speicherung der Substanz in diesen Geweben mit etwa folgender Staffelung:

Leber > Nieren $\cong$ Milz > Tumor > Lunge > Muskel^{16, 61}.

In anderen Geweben ist zum gleichen Zeitpunkt HpD fast vollständig ausgewaschen. Das Gehirn lagert, bedingt durch die Blut-Hirn-Schranke, HpD nur bei entzündlichen und tumorösen Veränderungen ein¹⁶.

Viele Tumoren haben eine gestörte Gefäßpermeabilität und/oder Lymphdrainage¹⁶. Es wird daher verständlich, daß eine Vielzahl von Tumoren unterschiedlicher Herkunft HpD anreichern. Weitgehend ungeklärt ist noch, wie das um die tumorösen Zellen angereicherte HpD dann in die Zellen eintritt. Hydrophobes Verhalten einiger Hämatorporphyrin-Derivate scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll^{90, 135}.

2.1.3 Photosensibilisierung von Gewebe durch HpD

Dort, wo sich HpD anreichert, führt es zu einer Photosensibilisierung des Gewebes. Um diese Eigenschaft des HpD optimal zu nutzen, ist es von großer Wichtigkeit, für die Behandlung Licht einer Wellenlänge zu wählen, welche von HpD absorbiert wird. Nur von HpD absorbiertes Licht erzeugt dessen zytotoxische Wirkung³³.

Abb. 3 zeigt das Absorptionsspektrum von HpD. Es zeigt sich, daß es mehrere Wellenlängenbereiche gibt, in denen Licht von HpD stark absorbiert wird. Die stärkste Absorption findet man bei 400 nm. Licht dieser Wellenlänge ist aber in der Therapie mit HpD-photosensibilisierten Tumoren nicht geeignet, denn die Absorption des Lichtes durch das Gewebe ist bei Wellenlängen unter 600 nm groß^{32, 33, 38}. Dieser Effekt, verursacht vor allem durch das Hämoglobin³², verhindert, daß im Gewebe genügend Licht kürzerer Wellenlänge das HpD erreicht und die phototoxische Wirkung hervorruft. Abb. 4 zeigt als Beispiel die Wellenlängenabhängigkeit der Absorption von Licht in

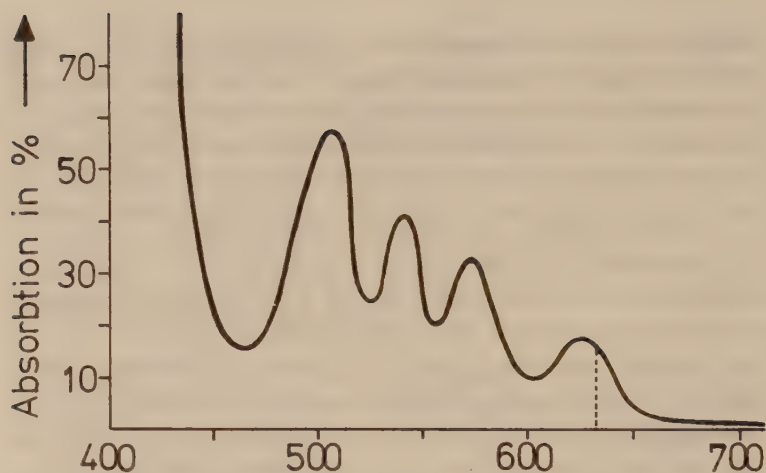


Abb. 3: Wellenlängenabhängigkeit der Absorption von Licht durch HpD (in menschlichen Serum) ⁹³; ---- $\hat{=}$ 630 nm.

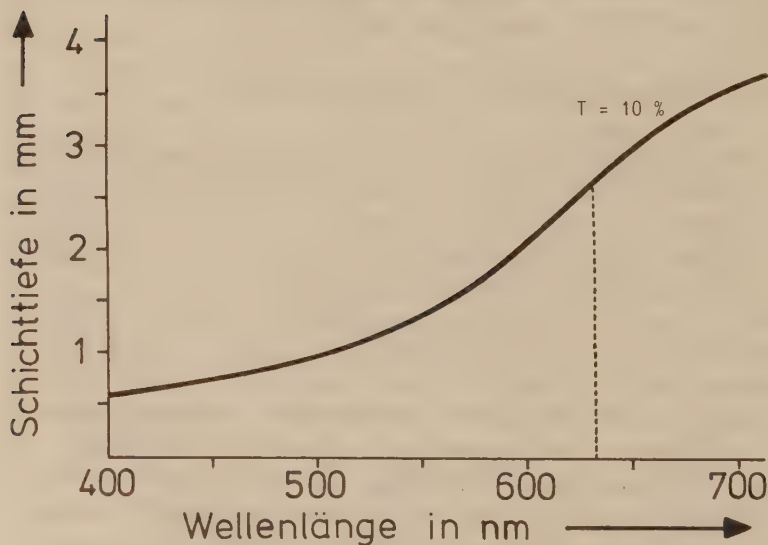


Abb. 4: Wellenlängenabhängigkeit der Absorption von Licht in menschlicher Haut am Beispiel der "10 % Dicke" ⁶⁸.
(Transmission von 10 % der Strahlungsleistung : $T = 10 \%$)

menschlicher Haut. Dargestellt ist die Kurve der Schichttiefen (mm), in denen noch 10 % der ursprünglichen Lichtleistung gemessen werden. Vergleicht man Abb. 3 mit Abb. 4, so erkennt man, daß bei 630 nm HpD Licht mit ca. 20 % relativ stark absorbiert^{33, 41}, während die Absorption durch Gewebe (Haut) relativ gering ist; 10 % der Lichtleistung erreichen etwa 2,7 mm Schichttiefe. Aus diesem Grund wird in der Photochemotherapie mit HpD zumeist Licht im Bereich um 630 nm verwendet^{33, 37, 86, 115}.

Auf Grund welcher biochemischer Veränderungen die phototoxische Reaktion bei der Behandlung mit HpD abläuft, ist nur teilweise bekannt. Ursache scheint die HpD-vermittelte Entstehung von Singulett-Sauerstoff zu sein. Singulett-Sauerstoff ist ein kurzlebiger, angeregter Zustand des Sauerstoffmoleküls. Der Sauerstoff in diesem Zustand ist in der Lage, Zellen an verschiedenen Stellen zu schädigen. Nahm man zuerst an, daß vor allem die Zellmembran und die Membranen von Zellorganellen von Singulett-Sauerstoff geschädigt werden, (Schädigungen von Membranproteinen und Störung des Na^+/K^+ - sowie Glukosetransportes ließen sich beweisen^{49, 60, 130}), so konnte man später zeigen, daß u. a. auch intrazelluläre Proteine, Nukleinsäuren und Phospholipide bei der Photochemotherapie mit HpD destruktiven Veränderungen unterliegen^{24, 74, 135}.

Resultat der zellschädigenden Wirkung des Singulett-Sauerstoffs ist die Zytolyse. Histologische Untersuchungen behandelter Gewebe zeigen Thrombosierungen kleinster Gefäße und Nekroseherde^{16, 24}.

2.2 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH Neuherberg (GSF) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich ausschließlich um weibliche Inzuchtmäuse vom Stamm C3H-Neuherberg. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Transplantation etwa 10 - 14 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 20 - 25 g. Sie wurden mit dem Standardfutter Altromin und Wasser versorgt.

Während des Versuchs wurden die Mäuse in Kunststoffkäfigen zu etwa 10 Tieren gehalten, mußten jedoch in der Regel umgruppiert werden, da ihre Tumoren unterschiedlich schnell wuchsen und nur gleichgroße Tumoren zur Behandlung kamen. Nach Applikation von HpD wurden die Mäuse etwa 4 Wochen in einem abgedunkelten Raum gehalten, da sie vor direktem Sonnen- und Kunstlicht geschützt werden mußten.

2.3 Tumor

Bei dem Versuch wurde das spinozelluläre Karzinom AT 51 verwendet. Dabei handelt es sich um ein spontanes Karzinom der C3H-Maus, welches durch mehrere in vitro-Passagen kloniert worden ist.

2.3.1 Histologie

Im histologischen, HE gefärbten Präparat des unbehandelten Tumors (siehe Abb. 5) sieht man einen gut abgesetzten Knoten im subkutanen Fettgewebe unter tierspezifischer Dermis. Polymorphe Zellkerne mit teils ovalen, teils spindeligen oder bizarren Formen zeigen deutliche Größenschwankungen. Blasige oder mehr granulär strukturierte Kerne kommen dabei vor. Vereinzelt findet man auch Nukleoli. Die Kerne stehen dichtgedrängt und bilden wirbel- oder fischzugartige Muster. Das basophile Zytoplasma ist fein granulär; Zellgrenzen oder Desmosomen sind nicht erkennbar. Ganz vereinzelt findet man dyskeratotische Zellen. Neben vielen Mitosen fallen noch mehrere Nekroseherde im Zentrum des Tumors auf, die auch kleine Einblutungen und Ansammlungen von Leukozyten aufweisen.

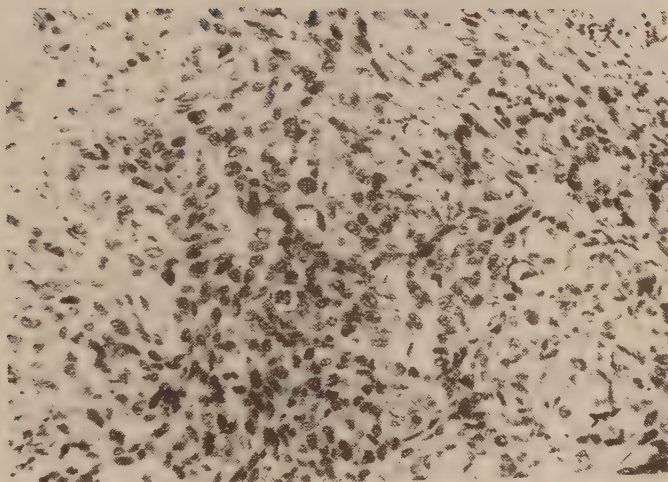


Abb. 5: Histologisches Präparat des unbehandelten spinozellulären Karzinoms der Maus - AT 51.

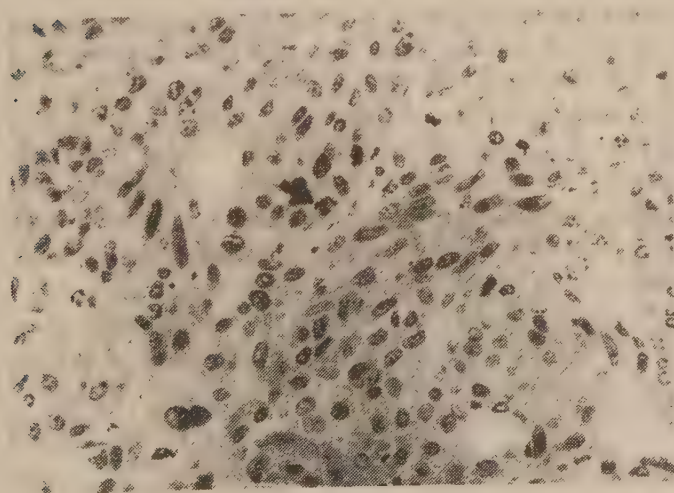


Abb. 6: Autoradiographisches Präparat des selben Tumors wie in Abb. 5, (Pfeil = markierter Zellkern).

2.3.2 Autoradiographische Untersuchung des Tumors

Eine Markierung der in Proliferation befindlichen Tumorzellen ist durch den DNS-spezifischen Einbau des radioaktiven ^3H -Thymidin-Nukleosids (^3H -TdR) möglich. Es wurde der Markierungsindex (LI) untersucht. Dieser Markierungsindex ist der prozentuale Anteil markierter Zellen von der Gesamtzahl der Zellen im histologischen Präparat¹⁴³.

$$\text{LI} = \frac{\text{Zahl der markierten Zellen}}{\text{Gesamtzahl der vitalen Zellen}} \cdot 100 \%$$

Der LI ist somit ein Maß für die Proliferation des Tumorgewebes.

Die Ergebnisse von sechs untersuchten Tumoren unterschiedlicher Masse sind in Tab. 1 zusammengefaßt, die Techniken zur Autoradiographie werden im Anhang beschrieben. Abb. 6 zeigt das autoradiographisch markierte Präparat des gleichen unbehandelten Tumors von Abb. 5.

Vergleichbare Werte von Autoradiographien epithelialer Tumoren der Maus stehen in der Literatur nicht zur Verfügung. Außerdem ist der Vergleich von Ergebnissen verschiedener Untersucher bei diesem Verfahren nur bedingt zulässig (siehe Anhang). Markierungsindizes menschlicher Plattenepithelkarzinome schwanken zwischen 8 % und 17 % mit einem geometrischen Mittelwert bei 11,5 %¹⁴⁵. Das entspricht etwa dem gemittelten Markierungsindex von 12,4 % in diesem Versuch. Die LI-Werte der sechs untersuchten Tumoren unterschiedlicher Masse liegen dabei sehr dicht beieinander, sodaß eine Masseabhängigkeit des Index nicht festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend ergibt sich aus Histologie und Autoradiographie das Bild eines entdifferenzierten spinözellulären Plattenepithelkarzinoms hoher Malignität. Änderungen der Histologie sowie der Wachstumskinetik konnten in diesem Versuch über mehrere Tumorgenerationen nicht beobachtet werden.

Tier Nr.	Tumormasse (mg)	gezählte Zellen gesamt	gezählte Zellen unmarkiert	gezählte Zellen markiert	Markierungs- index LI (%)
194	21	611	545	66	10,8
181	28	576	509	67	11,6
186	30	457	400	57	12,5
196	94	794	681	113	14,2
189	150	1018	897	121	11,9
199	190	946	823	123	13,0
Summe		4402	3855	547	$\bar{x} = 12,4$

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Autoradiographien
von Tumoren unterschiedlicher Masse.

2.4 Techniken zur Tumorinduktion

Zur Tumorinduktion wurden den Mäusen Tumorgewebsstücke subkutan transplantiert. Die Transplantationen erfolgten im Tierstall der Strahlenbiologischen Abteilung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH Neuherberg (GSF). Von der Strahlenbiologischen Abteilung der GSF wurden ebenfalls das Tumormodell und die im folgenden beschriebenen Techniken zur Induktion von Tumoren übernommen.

2.4.1 Auswahl des Spenders

Als Spender zur Herstellung von Transplantaten dienten Mäuse, die einen Tumor mit der Masse von etwa 600 mg (siehe 2.6) trugen. Je nach Zustand des Tumors reichte dieser für die Transplantation von 60 - 80 Mäusen aus. Auch größere Tumoren konnten noch zur Herstellung von Transplantaten verwendet werden. Sie waren aber in der Regel weniger ergiebig, da sie oft viel nekrotisches Material enthielten und nur der Wandbereich verwendet werden konnte.

Der Spendertumor durfte weder mit der Haut noch mit der Brustwand verwachsen sein. Nur regelrecht gewachsene Tumoren wurden verwendet, d.h. die Masse von 600 mg sollte in ungefähr 40 Tagen erreicht worden sein. Zu langsam wachsende Tumoren waren oft schon mit 100 mg nekrotisch und daher ungeeignet.

2.4.2 Exstirpation des Spendertumors, Vorbereitung der Transplantate

Die Spendermaus wurde getötet und die Exstirpationsstelle mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Unter sterilen Kautelen wurde nach einem Hautschnitt der Tumor aus den subkutanen Bindegewebsschichten gelöst und in eine Petrischale mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dort wurde er von anhängendem Binde- und Fettgewebe befreit und anschließend in frischer Kochsalzlösung gewaschen.

Mit einer Rasierklinge wurden nun Würfel mit einer Kantenlänge von 1 - 2 mm geschnitten. Dabei war darauf zu achten, daß nur festes,

weißlich-glasiges Material verwendet wurde. Tumorteile, die aufgelockert erschienen oder weich waren, sowie Bezirke mit vielen Blutgefäßen wurden verworfen. Die geschnittenen Würfel mußten von anhängenden Gewebsteilen und Blutgefäßen befreit und bis zur Fertigstellung aller Transplantate in Kochsalzlösung aufbewahrt werden. Anschließend wurden die Transplantate sechsmal in jeweils frischer physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um noch an ihrer Oberfläche haftendes, freies Material zu entfernen.

2.4.3 Vorbereitung der Empfängertiere

Die Empfängertiere waren schon einen Tag vor der Transplantation an der rechten Körperseite zwischen Becken und Schulter rasiert worden. Sie waren so am Tag der Transplantation ruhiger. Kleinere Hautverletzungen waren nicht immer vermeidbar, verheilten jedoch bis zum Versuchsbeginn.

2.4.4 Narkose

Die Empfängertiere wurden mit Hexobarbital (Evipan^R) narkotisiert. Hierzu wurden 5 ml Hexobarbital mit 25 ml isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Die intraperitoneal zu injizierende Menge betrug 0,15 - 0,20 ml. Nach kurzem Exitationsstadium trat die Narkose nach ca. 3-5 Minuten ein und hielt mindestens 10 Minuten an. Dies reichte aus, um etwa 10 Tiere narkotisieren und anschließend transplantieren zu können.

Als weiteres Narkotikum wurde Propanidid (Epontol^R) verwendet. Die intraperitoneal unverdünnt zu spritzende Menge betrug 0,4 - 0,5 ml. Die Narkose trat schon nach einer Minute ein, hielt jedoch nur 3 - 5 Minuten an, sodaß höchstens jeweils 5 Tiere narkotisiert und transplantiert werden konnten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Versuchstiere die Narkose mit Epontol^R wesentlich besser tolerierten. Überdosierungen wie mit Evipan^R kamen dabei nicht vor. Um größere Tierzahlen zeitsparend zu transplantieren, ist die Wirkungsdauer von Epontol^R jedoch zu kurz.

2.4.5 Transplantation

Zur Transplantation wurde die Haut der Empfängermaus an der Transplantationsstelle mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Sodann wurde ein kleiner Hautschnitt mit der Schere etwa 3 - 4 cm kaudal der rechten Skapulaspitze gesetzt. In eine vorn stumpf geschliffene Punktionskanüle (Abb. 7) wurde mit einer feinen Pinzette ein Transplantat eingelegt. Der in die Kanüle eingepaßte Mandrin wurde dazu etwa 1 cm zurückgezogen.

Die Transplantationskanüle wurde nun in den Hautschnitt eingeführt und bis ca. 1 cm seitlich der Wirbelsäule in den subkutanen Verschiebeschichten der Haut vorgeschoben. Die Kanüle sollte dabei von den Schichten geführt werden und nicht in oberflächlicheres oder tieferes Gewebe einstechen. Bei richtiger Lage der Kanülenspitze wurde das Transplantat mit dem Mandrin aus der Kanüle geschoben. Beim Herausziehen der Transplantationskanüle mußte mit dem Zeigefinger der freien Hand das Transplantat durch die Haut hindurch fixiert werden, da es sonst seine Lage beim Zurückschnellen des elastischen Gewebes noch änderte. Die Einstichstelle wurde nochmals mit Alkohol desinfiziert, ebenfalls die Kanüle und der Mandrin vor der folgenden Transplantation.

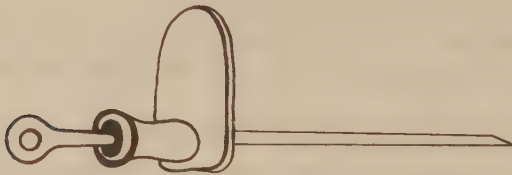


Abb. 7: Transplantationskanüle mit Mandrin.

Die Hautschnitte heilten bei allen Mäusen innerhalb von einer Woche ohne Komplikationen ab. Infektionen des Stichkanals wurden ebenfalls nicht beobachtet. In einzelnen wenigen Fällen entwickelte sich im

Stichkanal ein zweiter, mit dem anderen nicht verbundener Tumor. Diese Tiere wurden für den Versuch nicht verwendet.

2.4.6 Tumorinduktion von intracutanen Tumoren

Um ein dem spontan wachsenden spinozellulären Karzinom möglichst ähnliches Modell zu verwenden, wurde zu Beginn des Versuches die Induktion intracutaner Tumoren vorgenommen. Dazu wurde eine Zellsuspension des AT 51 hergestellt (siehe Anhang), die mit einer feinen Kanüle intracutan gespritzt werden sollte. Es zeigte sich jedoch, daß die Haut der Maus zu dünn war, um sicher punktiert werden zu können und um die benötigte Flüssigkeitsmenge aufzunehmen. Daher lief oft ein Teil der Zellsuspension aus dem Einstich heraus oder verteilte sich in tieferen Schichten. Die Folge war, daß ein Teil der Tiere keinen Tumor bekam oder die Tumoren zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten angingen. Darüberhinaus bildeten sich oft ovale oder polyzyklische Tumorformen aus, die nicht durch Schablonen (siehe 2.6) gemessen werden konnten. Diese Methode erwies sich somit als ungeeignet zur Erzielung intracutaner Tumoren in größerer Anzahl. Sie wurde daher nicht weiter angewandt und auf die Arbeit mit intracutanen Tumoren verzichtet. Die Induktion subcutaner Tumoren mittels einer Zellsuspension liefert dagegen gute Ergebnisse, ist jedoch zeitaufwendiger als die Transplantation.

2.5 Kennzeichnung der Versuchstiere

Anfangs wurden die Tiere mit nummerierten Ohrenklips gekennzeichnet. Diese rissen jedoch oft aus, sodaß die Tiere nicht mehr identifiziert werden konnten und für den Versuch ausfielen. Die Kennzeichnung durch Stanzmarken an den Ohren ließ eine eindeutige Identifizierung zu. Sie wurde in einer Narkose zusammen mit der Transplantation durchgeführt. Nur selten riß ein gestanztes Loch ein. Das Tier wurde dann mit einem Farbstift zusätzlich markiert.

2.6 Messung der Tumormasse in vivo

Zur Messung der Tumormassen wurden Plexiglaslochsablonen verwendet, die nach Vorgabe des Strahlenbiologischen Instituts der GSF angefertigt wurden. Die 24 kreisförmigen Löcher, die auf zwei Schablonen verteilt waren, hatten Durchmesser von 5,6 - 18 mm und waren bei Versuchen der GSF auf den Tumor AT 51 mit den Tumormassen von 23 - 1670 mg geeicht worden.

Etwa 14 - 16 Tage nach der Tumorinduktion hatten die ersten Tumoren den Durchmesser des kleinsten Loches einer Schablone und wurden von diesem Zeitpunkt an täglich und etwa zur gleichen Tageszeit gemessen. Dabei wurde versucht, das am besten passende Loch über den Tumor zu stecken. Um den Tumor dem jeweiligen Loch zuordnen zu können, mußte die Schablone den Tumor dicht umschließen, auch wenn man die Haut unter Druck noch leicht verschob. Er durfte dabei aber nicht fest im Loch der Schablone eingeklemmt sein. Bei Tumoren, deren Größe man zwischen zwei Löchern der Schablone einordnete, gab man einen mittleren Wert der beiden in Frage kommenden Löcher an.

Beim Vergleich mit der Messung anderer Personen stellte sich heraus, daß wir (bei ein und dem selben Tumor) zu leicht voneinander abweichenden Ergebnissen kamen, da ein subjektives Moment nicht vollkommen auszuschließen war. Sämtliche Messungen zu diesem Versuch wurden daher von mir selbst durchgeführt, um den Fehler gleichzuhalten. In einzelnen Fällen wurde Versuchstieren Tumoren zur Transplantation oder Histologie entnommen, die direkt zuvor mit der Schablone gemessen worden waren. Bei der anschließenden Bestimmung der Tumormasse mit der Waage stellte sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den zuvor gemessenen Werten heraus.

Trotzdem erhebt diese Art der Messung nicht den Anspruch auf genaue Bestimmung der absoluten Tumormassen. Vielmehr ist der Zweck der Messung, die Änderung der Tumormassen möglichst genau verfolgen zu können.

Schwierig oder unmöglich wurde die Messung mittels der Lochsablone, wenn durch eine Behandlung der Tumor große, ulzerierende

Defekte entwickelte, nur als Wall imponierte (siehe Abb. 18) oder ovale Formen annahm. Einige Tiere fielen so für den Versuch aus. Die Masse anderer defekter Tumoren war dagegen gut abzuschätzen. Relativ gut zu schätzen waren z.B. Tumormassen kugeligter Tumoren, deren obere Hälfte oder oberes Drittel durch die Behandlung zerstört wurde. Solchermaßen, durch zusätzliches Abschätzen des Defektes, zustande gekommene Meßwerte sind in dem Ergebnisteil als 'geschätzte Werte' kenntlich gemacht.

Die Messungen begannen ca. eine Woche vor der Behandlung der Tiere und wurden bis ca. 3 - 4 Wochen nach der Behandlung fortgeführt. Sie wurden aber beendet, wenn ein Tumor das größte Loch der Schablonen erreicht hatte.

Um möglichst objektive Meßwerte zu erhalten, wurden behandelte Tiere und Tiere der Kontrollgruppen gemischt in Käfigen gehalten. Während der Messung war mir so nicht bekannt, ob und wie ein Tier behandelt worden war.

Die Meßwerte der Tumormassen wurden unter der Code-Nummer des jeweiligen Tieres protokolliert. Die Decodierung erfolgte erst nach Abschluß des Versuches. Dadurch waren mir beim Messen die Werte der Vortage nicht bekannt, was eine Selbstbeeinflussung ausschließen sollte.

2.7 Auswahl der Versuchstiere für die Behandlung

Zu Beginn eines Behandlungsdurchganges wurde jeweils festgesetzt, mit welcher Tumormasse die Tumoren zur Behandlung kommen sollten (Sollgewicht). Für Versuche, bei denen z.B. die Wachstumskinetik der Tumoren verfolgt wurde, betrug das Sollgewicht 60 mg am Behandlungstag. Da das HpD aber 24 Stunden vor einer Behandlung injiziert wurde, mußte die Wachstumskinetik der Tumoren genau verfolgt werden, um den geeigneten Zeitpunkt für die Injektion zu finden. Im allgemeinen gelang es, das Tumorstadium so abzuschätzen, daß die Tumoren 24 Stunden nach der Injektion von HpD ihr Sollgewicht von 60 mg mit einer Abweichung von maximal 10 % erreichten. Im anderen Fall wurden die Tiere nicht für den Versuch verwendet.

Nur Tumoren die innerhalb des Zeitraumes von 10 Tagen zueinander ihr Sollgewicht erreichten, wurden für die Behandlung ausgewählt. Dadurch waren zu schnell und zu langsam wachsende Tumoren vom Versuch ausgeschlossen. Es zeigte sich jedoch nach mehreren Versuchen, daß auch Tumoren die noch später ihr Sollgewicht erreichten, im weiteren Verlauf die gleiche Wachstumskinetik hatten. Nur ihre Latenzzeit bis zum Wachstumsbeginn war also länger.

Darüber hinaus wurden Tumoren aussortiert, die Hautdefekte aufwiesen oder keine Kugelgestalt hatten.

Bei der Berücksichtigung dieser Kriterien sowie der Erfolgsrate der Transplantationen kamen im Durchschnitt weniger als 50 % der ursprünglich transplantierten Tumoren für die Beobachtung der Wachstumskinetik in Frage. Die restlichen Versuchstiere konnten jedoch für parallel laufende Versuche, wie Temperaturmessungen im Tumor u.a., verwendet werden.

Die zur Behandlung ausgewählten Tiere wurden auf die verschiedenen Behandlungsgruppen (Tiere, die in gleicher Weise behandelt werden) verteilt, indem die Gruppen nacheinander mit je einem Tier in immer gleicher Reihenfolge aufgefüllt wurden. So sollte vermieden werden, daß eine Behandlungsgruppe sich nur aus langsam-, eine andere nur aus schnell-wachsenden Tumoren zusammensetzte. Eine randomisierte (d.h. zufällige) Auswahl wurde dadurch sichergestellt.

2.8 Injektion von HpD

Wegen der Lichtempfindlichkeit von HpD wurden die Injektionen am Abend durchgeführt, der Raum war abgedunkelt.

Das HpD, welches für den Versuch zur Verfügung stand, hatte 2,5 mg Wirksubstanz / ml. Um eine Dosis von 10 mg / kg Körpergewicht zu injizieren, benötigte man bei den etwa 25 g schweren Mäusen 0,1 ml der Lösung. Da eine größere Menge genauer zu injizieren ist, wurde nochmal mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Das im Kühlschrank gelagerte HpD war zum Schutz vor Licht in

Aluminiumfolie eingewickelt - ebenso die zum Verdünnen und zur Injektion bestimmten Spritzen. Dadurch wurde sowohl das blasenfreie Aufziehen als auch das Mischen und Spritzen der Lösung ohne Sichtkontrolle sehr problematisch. Die Technik wurde daher zuvor geübt, ohne daß die Spritzen in Aluminiumfolie eingewickelt waren.

Es bewährte sich, bei der Injektion von HpD den Stempelstiel der Spritze 1 - 2 cm vom Stempelkolben entfernt mit einem Filzstift zu markieren. So konnte der Stempelkolben, der selbst von der Aluminiumfolie verdeckt war, von z.B. 0,7 ml auf 0,5 ml der Skala vorgeschoben werden, indem man die Strichmarkierung im sichtbaren Teil der Skala von 0,9 ml auf 0,7 ml vorsob. Die Lösung war dadurch fortwährend vor Lichteinwirkung geschützt.

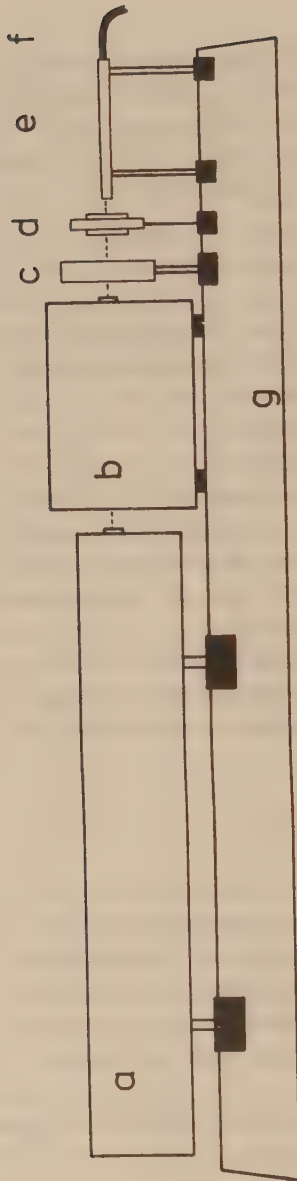
Nach dem Spritzen konnte ein Rest der Lösung, der verworfen wurde, auf das Vorhandensein von Blasen und seine Homogenität im durchscheinenden Licht geprüft werden. Diese zusätzliche Kontrolle war nötig, da bei den geringen Mengen, die zu injizieren waren, schon z.B. eine einzige Blase in der Lösung die Dosis bei einem Versuchstier bis um etwa die Hälfte vermindert hätte.

Den Tieren wurde 24 Stunden vor der Lichtbehandlung 0,2 ml der verdünnten Wirksubstanz intraperitoneal appliziert. Sie wurden anschließend für ca. 4 Wochen in abgedunkelten Räumen gehalten, um allgemeine Lichtschäden zu vermeiden.

2.9 Versuchsanordnung für die Lichtbehandlung

Für die Bestrahlung der Tumoren wurde eine Lichtquelle benötigt, die rotes Licht in einem schmalen Wellenlängenbereich um 630 nm emittierte (siehe 2.1.3). Die Leistungsdichte sollte in der Ebene des Tumors (Behandlungsebene) über einen möglichst großen Bereich variabel sein. Diese Leistungsdichten mußten in einer den Tumoren entsprechenden großen Querschnittsfläche zur Verfügung stehen; das Licht sollte homogen sein.

Diese Bedingungen erfüllte die Kombination eines Argon-Ionen-Lasers mit einem Farbstofflaser (Dye-Laser) zusammen mit einer geeigneten



a: Argon-Ionen-Laser
b: Dye-Laser
c: Elektromagnetischer Verschuß

d: Linse, $f=100$ mm
e: Justierrohr für Quarzfaserlichtleiter
f: Quarzfaserlichtleiter
g: Justierschiene

Abb. 8: Versuchsanordnung der Lichtquelle.

Optik, bestehend aus einer Linse, Quarzfaserlichtleiter, Mattscheibe und Blende.

2.9.1 Laser

Der Argon-Ionen-Laser der Marke Spectra-Physics, Modell 165-09, brachte eine Ausgangsleistung von 6 Watt (all lines) im Single-Mode-Betrieb. Um die Ausgangsleistung des Farbstofflasers noch zu erhöhen, wurde der Argon-Ionen-Laser auf Multi-Mode-Betrieb umgerüstet, seine Ausgangsleistung dadurch auf > 8 W gesteigert.

Der Argon-Ionen-Laserpumpte optisch einen Dye-Laser der Marke Spectra-Physics, Modell 375, der mit dem Farbstoff DCM oder, wenn geringere Ausgangsleistungen benötigt wurden, wahlweise mit dem Farbstoff Rhodamin 590 (Rhodamin 6G) betrieben werden konnte. Mit dem integrierten Tuning-Wedge-Element konnte die Wellenlänge des Lichtes auf 630 nm eingestellt werden (Halbwertsbreite: 0,2 - 0,3 nm). Bei dieser Wellenlänge betrug die Ausgangsleistung des Dye-Lasers (bei Verwendung des Farbstoffs DCM) maximal 2,4 W. Sowohl Farbstoff- als auch Argon-Laser waren gemeinsam auf einer Justierschiene fixiert (siehe Abb. 8).

2.9.2 Modifikation des Lichtstrahles

Ebenfalls auf der Justierschiene sitzend wurde als nächstes eine elektromagnetisch zu betätigende Blende in den Strahlengang eingefügt, mit welcher der Strahl unterbrochen werden konnte. Darauf folgte eine Linse mit der Brennweite $f = 100$ mm, die in zwei Richtungen senkrecht zur optischen Achse exakt justierbar war. Diese Linse bündelte den Lichtstrahl in das konisch aufgeweitete Ende eines Quarzfaserlichtleiters von 0,3 mm Durchmesser. Die ersten 20 cm des Lichtleiters wurden von einem starren Aluminiumrohr gehalten, das ebenfalls justierbar war.

Beim Durchgang durch einen Lichtleiter legen die eingestrahltten Lichtwellen unterschiedliche Wege zurück. Infolge von Interferenzen führt

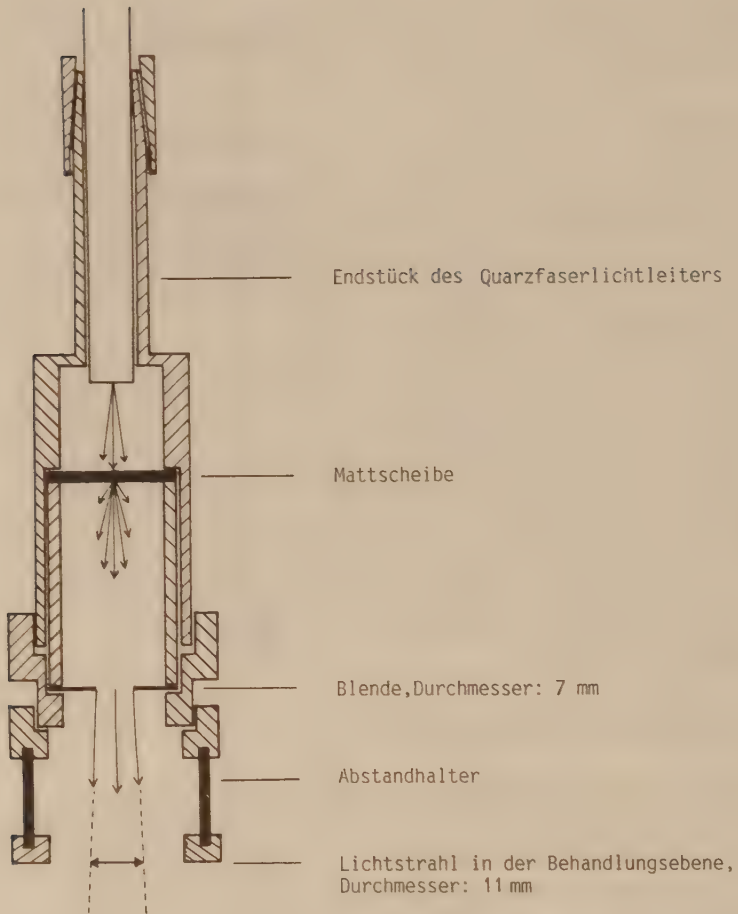


Abb. 9: Handlampe (1 : 1).

das, bei Einstrahlung von kohärentem Laserlicht, am Lichtleiterausgang zu einer inhomogenen Lichtverteilung. Am Ort der Bestrahlung (Tumor) würden helle und dunkle Flecken (sogenannte "speckles") in der Größenordnung von 1 mm Durchmesser entstehen. Um eine gleichmäßige Ausleuchtung des Tumors zu erzielen, wurde eine "Handlampe" (siehe Abb. 9) konstruiert, in der das Licht durch Streuung an einer Mattscheibe homogenisiert wird. Eine Blende am Ausgang der Handlampe begrenzte den Lichtstrahl auf 7 mm im Durchmesser. Durch einen Abstandhalter wurde eine fixe Entfernung der Blende zum Objekt garantiert. In der Behandlungsebene war der Lichtstrahl dann auf 11 mm aufgeweitet, was einer Bestrahlungsfläche von $0,95 \text{ cm}^2$ entspricht. Die Tumoren hatten am Behandlungstag einen Durchmesser von ca. 7 mm, d. h. ein 2 mm breiter Hautsaum rund um den Tumor wurde mitbestrahlt. Die Handlampe wurde von einem Stativ gehalten (siehe Abb. 10).

Charakteristische Eigenschaften des Laserlichtes wie Polarisation und räumliche Kohärenz wurden durch die oben beschriebene Anordnung aufgehoben - für den Versuch aber auch nicht benötigt. Genutzt wurden lediglich die frei wählbare Leistungsdichte in einem bestimmten Bereich sowie das streng monochromatische Licht.

2.9.3 Rotlampe

Neben dem Laser als Lichtquelle wurde für einen Versuch mit kleiner Tierzahl eine Rotlampe verwendet. Diese Rotlampe mit einer Leistung von 150 W hatte im Abstand von 5 cm einen Strahldurchmesser von 15 mm, was einer Leistungsdichte von 85 mW/cm^2 entspricht. Die Wellenlänge des Lichtes betrug 630 nm mit einer Halbwertsbreite von 18 nm. Um eine Wärmeentwicklung am Tumor zu verhindern, war die Lampe mit geeigneten Infrarotfiltern und Luftkühlung versehen. Durch einen Verschlußmechanismus im Strahlengang konnte auch mit Lichtimpulsen unterschiedlicher Frequenzen behandelt werden.

2.9.4 Halteapparat für das Versuchstier

Da die längste Bestrahlungsdauer 1 Stunde und 20 Minuten betrug, kam zur Ruhigstellung des Versuchstieres eine Narkose nicht in Betracht, da diese das Tier gefährdet hätte. Die sichere Ruhigstellung, bei der für das Tier schmerzlosen Behandlung, gewährleistete ein Halteapparat (siehe Abb. 11) aus einem halbierten Plastikrohr, in dem seitlich eine Aussparung von 1,5 cm im Durchmesser für den Tumor und die umgebende Haut geschnitten war. Durch zusätzliche Fixierung an Hals und Schwanz war das Tier fast vollständig daran gehindert, sich zu bewegen. Wenn nötig, konnte der Tumor leicht durch Nachführen des Apparates mit der Hand im Strahlengang gehalten werden.

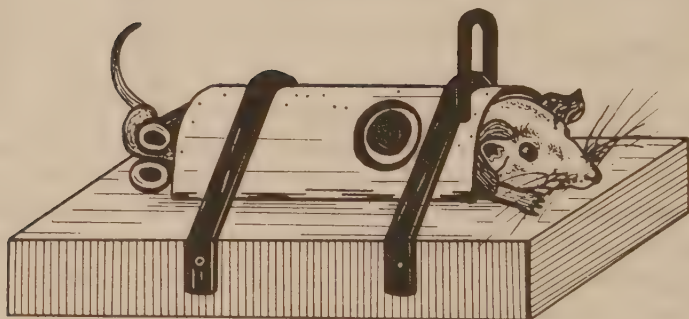
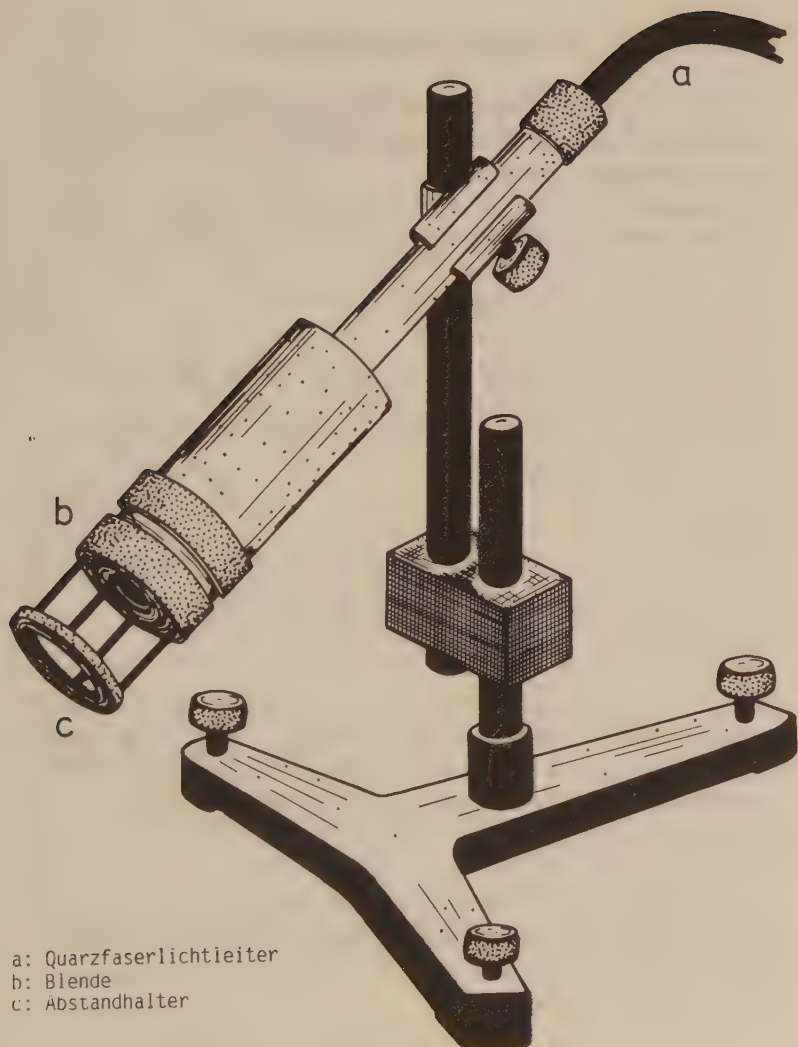


Abb. 11: Halteapparat für das Versuchstier.



a: Quarzfaserlichtleiter
b: Blende
c: Abstandhalter

Abb. 10: Handlampe und Stativ.

2.9.5 Bestimmung der Leistungsdichte und Dosis

Wichtige Bestrahlungsparameter für die Verwendung von Laserlicht sind neben der Wellenlänge die Leistungsdichte (Intensität), die Dosis und die Bestrahlungsdauer.

Die Leistungsdichte I ergibt sich aus der Laserleistung P in der Behandlungsebene geteilt durch die bestrahlte Fläche A.

Formel 1:

$$I = \frac{P}{A}$$

Die Leistungsdichte wird üblicherweise in der Dimension $\frac{W}{cm^2}$ angegeben.

Die Dosis D ergibt sich aus der Leistungsdichte I multipliziert mit der Bestrahlungszeit t.

Formel 2:

$$D = I \cdot t$$

Die Dosis hat die Dimension einer Energiedichte. Sie wird in $\frac{W \cdot sec}{cm^2} \hat{=} \text{Joule/cm}^2$ angegeben.

Die Leistungsdichte des Lichtstrahles in der Behandlungsebene wurde mit Hilfe eines Photoelementes der Fa. Siemens, Modell TP 60 (Durchmesser: 15 mm), und eines Amperemeters der Fa. Philips, Modell PM 2503, bestimmt. Bei voll ausgeleuchtetem Empfänger betrug der Eichfaktor $3,472 \frac{mW}{cm^2} / mA$.

Die Leistung des Lasers konnte am Lasernetzgerät so eingestellt werden, daß sich die gewünschte Leistungsdichte in der Behandlungsebene ergab. Die erreichbare Leistungsdichte in der Behandlungsebene betrug maximal $566 mW/cm^2$.

2.9.6 Wahl der geeigneten Lichtdosis

Da die wachstumshemmende Wirkung der Photochemotherapie mit HpD in Abhängigkeit von der verwendeten Leistungsdichte I untersucht werden sollte, mußte nach Formel 2 (siehe Kap. 2.9.5) die Dosis während der Versuche konstant gehalten werden. Man mußte daher zu Beginn eine geeignete Lichtdosis finden, die eine deutliche Wachstumsverzögerung der behandelten Tumoren gewährleistet. Andererseits sollten die Tumoren nicht zu stark geschädigt werden, da Dosen, die eine fast vollständige Tumorregression bewirken, für die Untersuchung von Wachstumsverzögerungen nicht geeignet sind. Die Beurteilung der Wirksamkeit verschiedener Leistungsdichten in der Behandlung mit HpD und Licht würde dabei unmöglich oder ergäbe statistisch wenig signifikante Ergebnisse.

Angaben in der Literatur über Lichtdosen in der Photochemotherapie mit HpD schwanken zwischen 8 J/cm^2 ^{146, 147, 148} und 1620 J/cm^2 ⁴²; häufiger verwendete Lichtdosen liegen bei ca. $50 - 200 \text{ J/cm}^2$ ^{32, 38, 41, 86, 139}. Da es sich hierbei um Behandlungen unterschiedlichster menschlicher und tierischer Tumoren in vivo und in vitro handelt, sind diese Angaben nicht einfach auf das hier verwandte Tiermodell übertragbar.

In einem Vorversuch wurden deshalb die Wirkungen unterschiedlicher Lichtdosen auf das Wachstum des AT 51 untersucht. Eine Leistungsdichte von 170 mW/cm^2 wurde dabei konstant gehalten. Dieser Vorversuch sollte lediglich, zusammen mit den Literaturangaben, die Grundlage zur Entscheidung für eine für den Versuch geeignete Lichtdosis bilden. Er erhebt wegen der geringen Zahl der Versuchstiere ($n_{\text{gesamt}} = 14$; $n_{\text{Dosis}} = 1$) keinen Anspruch auf statistische Auswertbarkeit.

2.9.7 Bestrahlungszeit

Aus dem in Kap. 2.9.6 beschriebenen Vorversuch resultierte eine geeignete Lichtdosis, die in den folgenden Behandlungen konstant ge-

halten wurde. Bei frei gewählten Leistungsdichten ist diese konstante Dosis jedoch nur durch eine entsprechend veränderte Bestrahlungszeit zu erzielen. Zur Berechnung der Bestrahlungszeit wird die Formel 2 nach t aufgelöst.

Formel 3:

$$t = \frac{D}{I}$$

Die gewählte Leistungsdichte und der konstante Wert für die Dosis können nun eingesetzt und die Bestrahlungszeit t in Sekunden errechnet werden.

2.9.8 Messung der Temperatur im Tumor unter Behandlung

Es sollte die Auswirkung der Behandlung mit Laserlicht nach und ohne HpD-Gabe auf die Temperatur im Tumor untersucht werden.

Es wurde dazu das Thermoelement Tastotherm D 1200 der Fa. Gultan verwendet. Dieses Gerät mit digitaler Anzeige hatte eine Ansprechzeit von 0,5 Sekunden und eine Auflösung von 0,1 °C. Die im Durchmesser 0,5 mm starke Meßsonde wurde während der Behandlung in den Tumor eingestochen und von Hand so gehalten, daß sich die Spitze der Sonde etwa im Zentrum des Tumors befand. Die im Abstand von 5 Sekunden abgelesenen Temperaturwerte wurden gegen die Zeit zu Meßkurven aufgetragen.

Über ein Infusionssystem mit Kanüle konnte während der Behandlung mit Laserlicht zur Kühlung isotonische Kochsalzlösung (Raumtemperatur) auf den Tumor getropft werden. Die Haut über dem Tumor mußte zuvor mit etwas Wasser gründlich eingerieben werden, da sonst die Tropfen abperlten und die Haut nicht benetzten.

2.10 Versuchsauswertung

2.10.1 Erstellung von Wachstumskurven

Mindestens 7 Tiere gehörten zu einer Behandlungs- bzw. Kontrollgruppe. Da die Tiere im Abstand von maximal 10 Tagen zueinander zur Behandlung kamen (siehe Kap. 2.7), waren die täglich gemessenen Werte untereinander nicht vergleichbar. Die Wertetabellen wurden daher in der Zeitachse so verändert, daß die Werte des Behandlungstages der Tiere alle in einer Reihe untereinanderstanden. Diese Werte am Behandlungstag schwankten mit einer Abweichung von maximal 10 % um das Sollgewicht, das mit 60 mg angesetzt war. Um die Wachstumsverläufe der einzelnen Tiere miteinander vergleichen zu können, mußte auch diese Abweichung rechnerisch korrigiert werden. Zur Standardisierung der Meßwerte am Behandlungstag auf 60 mg wurde für jedes Tier ein Korrekturfaktor ermittelt. Bei einem Tier, dessen Tumormasse am Behandlungstag z. B. mit 57 mg gemessen wurde, betrug der Faktor 1,053.

$$57 \text{ mg} \cdot 1,053 = 60 \text{ mg}$$

Alle folgenden Meßwerte eines Tieres über den Zeitraum von ca. 4 Wochen wurden mit dem jeweils ermittelten Faktor multipliziert.

Solchermaßen standardisierte Werte eines jeden Versuchstieres trug man zu Wachstumskurven auf (Ordinate: Tumormasse in mg; Abszisse: Zeit nach Behandlung in Tagen). Es ergaben sich in der Regel zwar insgesamt stetig ansteigende Kurvenverläufe, der Anstieg war dabei aber oft treppenförmig. Dies kam daher, da mit der Schablone die Tumormassen nicht kontinuierlich, sondern in fest vorgegebenen Massewertabständen gemessen wurden. Da man aber ein kontinuierliches Tumorstadium voraussetzen konnte - und für die statistische Auswertung mit dem Großrechner auch benötigte -, wurde versucht, für jedes Tier in die ermittelten Meßpunkte eine "optimale Kurve" hineinzuzeichnen.

Aus diesen Kurven eines jeden Versuchstieres konnte für jeden Tag nach der Behandlung der dazugehörige korrigierte Massewert abge-

lesen werden. Diese Werte wurden dann, genauso wie zuvor, zu Tabellen aufgetragen, sodaß gleiche Behandlungstage einer Behandlungsgruppe untereinanderstanden. Die Werte bildeten die Grundlage der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Für die verschiedenen Behandlungsgruppen konnten für jeden Tag nach der Behandlung die arithmetischen Mittelwerte berechnet und zu Wachstumskurven gegen die Zeit aufgetragen werden.

2.10.2 Growth Time, Regrowth Time und Growth Delay

In der Literatur wird oftmals das Wachstum von Tumoren durch die Zeit beschrieben, die sie benötigen, eine bestimmte Tumormasse zu erreichen (Wachstumszeit = Growth Time). Auch diese Art der Darstellung des Tumorwachstums soll hier Verwendung finden. Dazu mußte in den in Kap. 2.10.1 beschriebenen Wachstumskurven eines jeden Versuchstieres zu bestimmten Massewerten (wie 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360 mg, usw.) die dazugehörige Zeit in der Abzisse abgelesen werden, die ein Tumor benötigte, um diese Masse zu erreichen. Diese Werte wurden ebenfalls zu Tabellen aufgetragen und die arithmetischen Mittelwerte für die oben genannten Massenwertabstufungen gebildet.

Behinderte eine Behandlung das Wachstum einer Gruppe von Tumoren, so erreichten diese eine fixe Tumormasse im Mittel später als eine Kontrollgruppe nicht behandelter Tumoren (Regrowth Time).

Von den Mittelwerten der Regrowth Time einer behandelten Gruppe wurde dann für jeden der oben genannten Massenwerte die dazugehörigen Mittelwerte der Growth Time der Kontrollgruppe subtrahiert. Dadurch erhielt man denjenigen Zeitwert, um den behandelte Tumoren, verglichen mit unbehandelten Tumoren, eine bestimmte Tumormasse später erreichen (Wachstumsverzögerung = Growth Delay).

$$\text{Regrowth Time (RT)} - \text{Growth Time (GT)} = \text{Growth Delay (GD)}$$

Mit dem Growth Delay-Wert erhält man eine Größe, mit der der Erfolg einer Behandlung anschaulich beschrieben werden kann.

2.10.3 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden nur für solche Versuche durchgeführt, bei denen Behandlungen an Versuchstiergruppen von zumindest 7 Tieren vorgenommen wurden. Die Berechnungen erfolgten auf einem IBM-Großrechner mit dem Betriebssystem VM/CMS und den Programmpaketen SPSS^X und BMDP.

Für die Massewerte oder Wachstumszeitwerte der Tumoren einer Gruppe wurden für jeden Meßtag u. a. folgende Größen ermittelt:

		(Bezeichnung im Anhang)	
- arithmetischer Mittelwert	$\bar{x}$	MEAN	(Formel 4)
- kleinster Wert	$x_{\min}$	MINIMUM	
- größter Wert	$x_{\max}$	MAXIMUM	
- Varianz	SD^2	VARIANCE	(Formel 5)
- Standardabweichung	SD	STD DEV	(Formel 6)
- Standardfehler	SE	S.E. MEAN	(Formel 7)
- Abweichung von einer Normalverteilung		SKEWNESS	

Die Standardabweichung SD (standard deviation) gibt den Bereich an, in dem etwa 68 % der Meßwerte einer Stichprobe liegen.

Der Standardfehler SE (standard error) gibt den Bereich an, in dem der wahre Mittelwert mit der Wahrscheinlichkeit von etwa 68 % liegt.

Die Angabe des Standardfehlers wird allgemein immer mehr bevorzugt, wohl hauptsächlich deswegen, weil sein Wert die Standardabweichung des Mittelwerts darstellt, was oftmals aussagekräftiger ist¹⁵³.

Zur allgemeinen Vergleichbarkeit wird hier in den Graphiken der Standardfehler dargestellt, in den Tabellen des Anhangs sind aber Standardfehler sowie Standardabweichung angegeben.

Formeln zur statistischen Auswertung

Formel 4:
$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1} x_i$$

Formel 5:
$$SD^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right]$$

Formel 6:
$$SD = \sqrt{SD^2}$$

Formel 7:
$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

2.10.3.1 Beurteilung der Verteilung der Meßwerte

Für die uneingeschränkte Gültigkeit vieler statistischer Tests werden annähernd normalverteilte Meßwerte gefordert, d. h. die Meßwerte einer Gruppe je Meßtag sollen in Form einer "Gauss-Verteilung" um ihren Mittelwert streuen. Bei vielen biologischen Versuchen wird aber eine solche Verteilung nicht immer erreicht, zumal wenn - wie in dieser Untersuchung - wegen des großen Aufwandes nur mit begrenzter Tierzahl gearbeitet werden kann.

Zur Interpretation der Ergebnisse der statistischen Tests ist es daher wichtig, die Art der Verteilung der gemessenen Werte zu kennen.

Mit dem Großrechner wurden für alle zueinandergehörigen Wertegruppen (= Werte jedes Meßtages jeder Behandlungsgruppe) die Verteilung der Meßwerte in Form eines Histogramms graphisch dargestellt. Die Abweichung der Verteilungskurve im Histogramm von der ideal symmetrischen Gauss-Verteilungskurve wurde dazu (u. a.) durch einen Skewnesswert (Skewness = Schräge) angegeben. Die Variation des Skewnesswertes wird im allgemeinen zwischen + 0,300 und - 0,300 toleriert. Eine größere oder kleinere Skewness zeigt nicht normalverteilte Meßwerte an. Je nach Vorzeichen liegt das Maximum der tatsächlichen Kurve rechts (+) oder links (-) von dem Maximum der Kurve der Normalverteilung¹⁵³.

Abb. 11 zeigt als Beispiel eine nahezu ideale Verteilung der Meßwerte mit einer Skewness von - 0,097.

Die in Abb. 12 dargestellten Werte sind dagegen mit einer Skewness von + 0,334 gerade nicht mehr annähernd normalverteilt.

Man erkennt, daß bei der kleinen Fallzahl ($n = 7$) schon eine geringfügige Verschiebung der Meßwerte eine Normalverteilung ausschließt.

2.10.3.2 Regressionsanalyse

Aus je 7 Wachstumskurven von Tumoren gleicher Behandlung wurde durch die Bildung der Mittelwerte der Werte eines jeden Meßtages eine "gemittelte Wachstumskurve" erstellt (siehe 2.10.1). Dies ist nur

Abb. 11: Computerhistogramm mit normalverteilten Meßwerten. Skewnesswert = - 0,097; Zehn (*) $\hat{=}$ 1 Meßwert an der angegebenen Stelle.

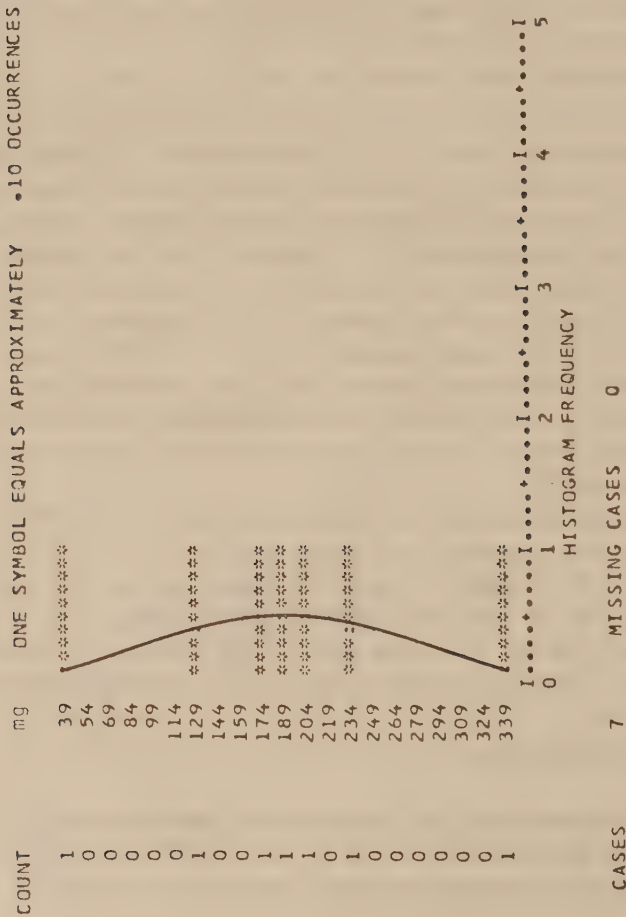
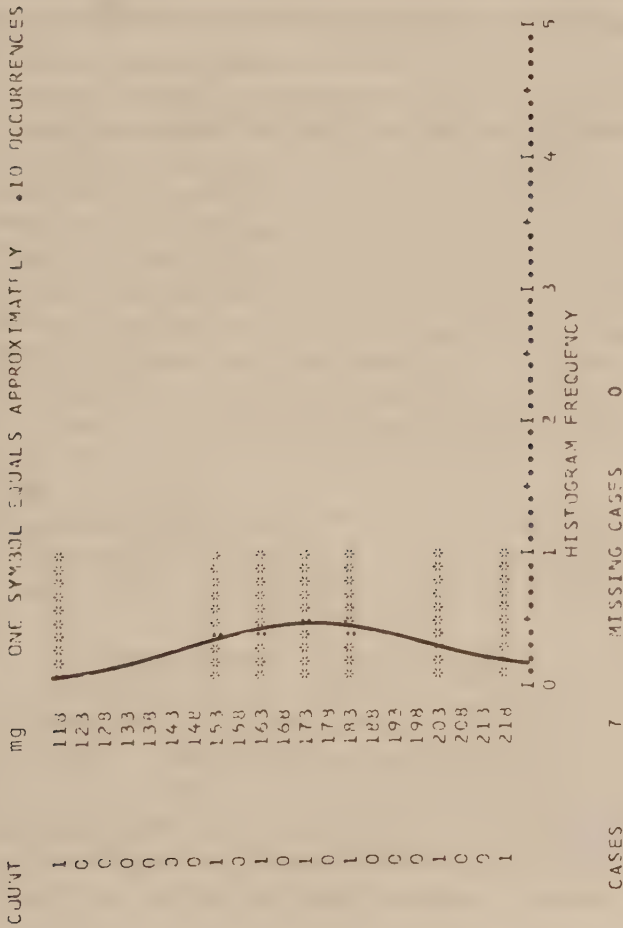


Abb. 12: Computerhistogramm mit nicht normalverteilten Meßwerten. Skewnesswert = + 0,334.



zulässig und sinnvoll, wenn die einzelnen Meßkurven nur durch zufällige Abweichungen voneinander verschieden sind - d. h. eine systematische Abweichung ausgeschlossen werden kann ("unverbundene Stichproben").

In einer Analyse der Regression prüft der Großrechner die Abweichungen der Meßkurven einer Gruppe voneinander (Güte der Meßkurven). Das hierfür verwendete Programm stammt aus dem Programmpaket: Statistical Package for Social Sciences, Version X (SPSS^x)¹⁵⁴.

Vereinfacht gesagt "legt" der Rechner in diesem Programm durch die Wachstumskurven der Tumoren einer Behandlungsgruppe eine "ideale Gerade" (Gerade mit der kleinsten Summe aller Abweichungen aller Meßwerte) . Zu dieser Geraden untersucht er die Abweichungen der einzelnen Meßwerte unter der Prüfung der 0-Hypothese: "Die Meßwerte stehen in zufälliger Beziehung zu der Geraden".

Wegen den zu jedem Test gehörenden alpha- und beta-Fehlern ist es nicht möglich, die Wahrscheinlichkeit der Alternativ-Hypothese direkt zu beweisen. Die berechneten Statistiken liefern deswegen einen Signifikanzwert für die 0-Hypothese. Der Signifikanzwert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die 0-Hypothese zutrifft. Aus den berechneten Signifikanzwerten ergeben sich folgende Signifikanzniveaus:

			Signifikanzniveau
Signifikanzwert	$\leq$ 0,0001	=	hoch signifikant (**)
Signifikanzwert	$>$ 0,0001 $<$ 0,0005	=	signifikant (*)
Signifikanzwert	$\geq$ 0,0005	=	nicht signifikant

Bei gleichem Signifikanzniveau macht ein Korrelationskoeffizient (Werte zwischen 0 - 1,0; optimaler Wert = 1,0) eine zusätzliche differenzierende Wertung der Güte von Meßkurven verschiedener Berechnungen möglich. Man kann dadurch eine Aussage treffen, in welcher Behandlungsgruppe die Meßkurven höherer Güte vorliegen.

Die Regression wurde nicht nur für die Meßwerte selbst, sondern auch für ihren natürlichen Logarithmus untersucht. Der Vergleich der beiden Korrelationskoeffizienten der einfachen sowie der logarithmi-

schen Berechnung (bei einer Behandlungsgruppe) erlaubt die Aussage, ob die Wachstumskurven linear oder eher von logarithmischem Verlauf - d.h. in der Art einer e-Funktion - sind. Abb. 13 und Abb. 14 stellen als Beispiel einer Regressionsanalyse die Meßkurven einer Behandlungsgruppe im linearen und logarithmischen Maßstab dar. Die "idealen Geraden" sind eingezeichnet. Der Signifikanzwert und der Korrelationskoeffizient sind angegeben. Man sieht, daß im logarithmischen Maßstab die Abweichungen der Wachstumskurven zu der Geraden geringer sind.

2.10.3.3 Statistische Auswertung der Wirksamkeit einer Behandlung

Üblicherweise werden zur Bewertung der Wirksamkeit verschiedener Behandlungen an Tumorgruppen im Modell deren gemittelte Wachstumskurven miteinander verglichen. Dabei wird der Abstand der Kurvenverläufe bzw. die Standardabweichung oder der Standardfehler in verschiedenen Bereichen der Kurven untersucht. Des weiteren gibt es statistische Tests (z. B. T-Test), die zwei Kurvenverläufe Punkt für Punkt miteinander vergleichen.

Nachteil dieser Betrachtungsweisen ist, daß eine statistische Aussage nur immer über jeweils 2 Punkte der beiden miteinander verglichenen Kurven gemacht werden kann. Die Beurteilung der gesamten Kurven wird dabei erst durch die Betrachtung einer Vielzahl von Einzelergebnissen möglich.

Mit einem Programm für multiple Regressionen (Programmpaket: Bio-medical Computer Programs (BMDP₈₃); Programm: 1 R) ist der Großrechner in der Lage, Verläufe kompletter Wachstumskurven - und damit die Wirksamkeit von verschiedenen Behandlungen - miteinander zu vergleichen und auf die Signifikanz ihrer Abweichungen zu überprüfen³¹. Die weitere Untersuchung, z. B. des Abstandes von Kurvenverläufen, der Streubreiten der Meßwerte, der Standardabweichungen usw. entfällt dabei, da der Rechner auf Grund aller Einzelwerte der Gruppen rechnet und solche Größen schon berücksichtigt sind.

Abb. 13: Wachstumskurven einer Behandlungsgruppe in der Regressionsanalyse (linearer Maßstab). Eingezeichnet ist die "ideale Gerade". Zahlenwerte der Kurven $\hat{=}$ Anzahl der Werte. Der für die statistische Auswertung benötigte Korrelationskoeffizient und der Signifikanzwert sind unterstrichen.

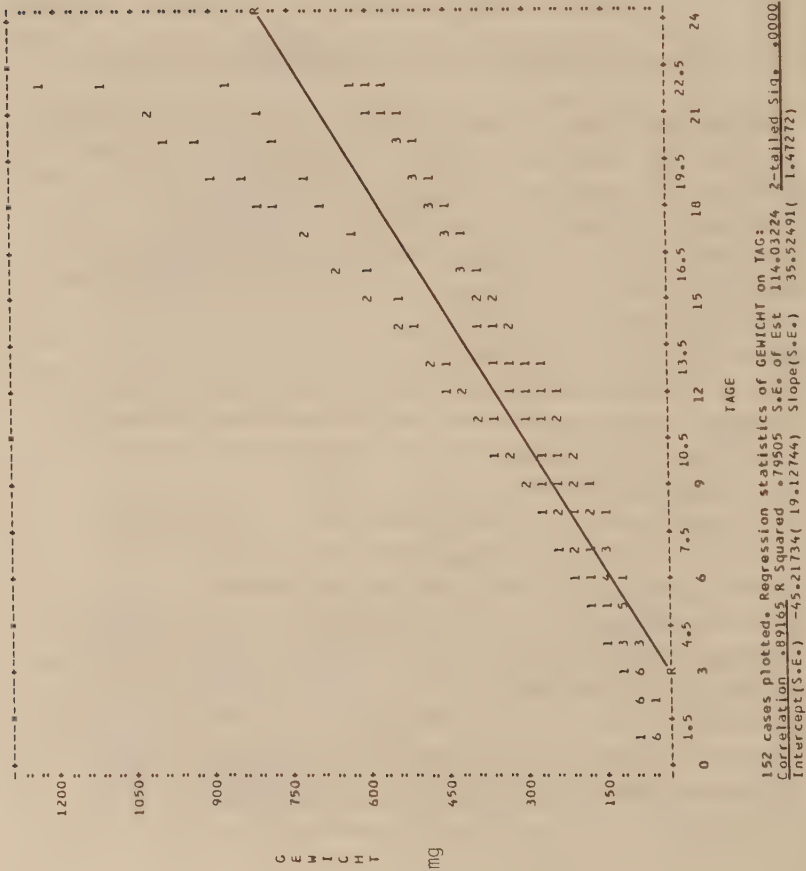
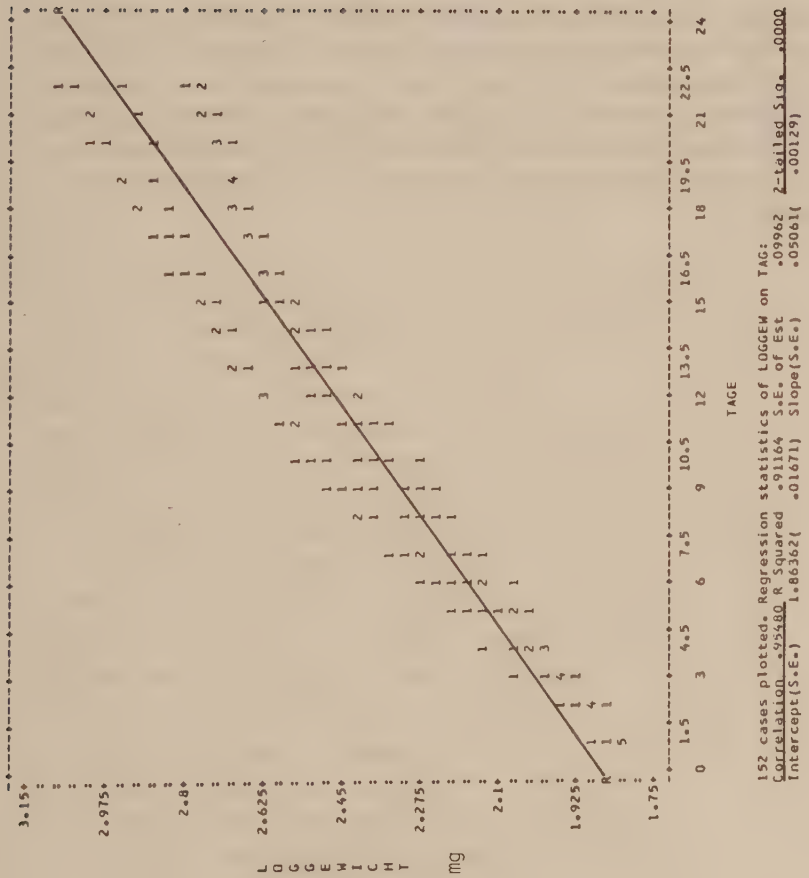


Abb. 14: Wachstumskurven der gleichen Behandlungsgruppe wie in Abb. 13 in logarithmischen Maßstab.



Die 0-Hypothese für dieses statistische Programm lautet: Zwei (oder auch mehrere) Wachstumskurven unterschiedlich behandelter Tumorgruppen sind ähnlich, Unterschiede nur zufällig².

Kann die 0-Hypothese verneint werden, so wird ein Signifikanzwert angegeben (Signifikanzniveau siehe 2.10.3.2). Bei gleich hohen Signifikanzniveaus erlaubt der Wert der F-Statistik noch eine weitere Differenzierung der relativen Wirksamkeit mehrerer Behandlungen zueinander. Dabei gilt, je größer der Wert der F-Statistik, desto größer ist der Unterschied zweier miteinander verglichener Kurvenverläufe. Maximal- oder Minimalwerte lassen sich für den F-Statistikwert nicht angeben.

Statistisch zuverlässig miteinander vergleichbar sind dabei nur Gruppen mit etwa gleich vielen Freiheitsgraden. Die Freiheitsgrade zwischen und innerhalb der Gruppen sind daher im Ergebnissteil mit aufgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der geeigneten Lichtdosis

Wie in Kap. 2.9.6 ausgeführt, wurde für die Untersuchungen mit variablen Leistungsdichten eine konstante Dosis benötigt, welche in diesem Versuch ermittelt werden sollte. Mit einer Tierzahl von $n_{\text{gesamt}} = 14$ und $n_{\text{Dosis}} = 1$ wurden bei einer Leistungsdichte von 170 mW/cm^2 Behandlungen mit Dosen zwischen $40 - 160 \text{ J/cm}^2$ durchgeführt. Die dafür errechneten Bestrahlungszeiten lagen zwischen 235 - 941 Sekunden (siehe Kap. 2.9.7). Wie bei allen folgenden Versuchen fand die Behandlung 24 Stunden nach Gabe von 10 mg/kgKG HpD statt (siehe Kap. 2.8). Die Bestrahlung wurde mit dem Farbstoff-Laser durchgeführt (siehe Kap. 2.9).

Die fünf Wachstumskurven in Abb. 15 stellen eine Auswahl der Ergebnisse der untersuchten Lichtdosen dar. Aus ihnen wird die Abhängigkeit der Wachstumsverzögerung der Tumoren von der verwendeten Lichtdosis ersichtlich.

Die Wachstumskurve 1 - Behandlung mit 40 J/cm^2 - entspricht dabei etwa der Wachstumskurve von unbehandelten Tumoren in Kap. 3.5. Eine Verdoppelung der Tumormasse wird nach 3,6 Tagen erreicht (bei unbehandelten Tumoren nach 3,5 Tagen); eine Verdreifachung wird nach 6,7 Tagen erreicht (bei unbehandelten Tumoren nach 6 Tagen). Auch der weitere, in Abb. 15 nicht dargestellte Kurvenverlauf entspricht dem der in Kap. 3.5 dargestellten Wachstumskurve unbehandelter Tiere.

Die Wachstumskurven 2 bis 5 - Behandlung mit $60 - 160 \text{ J/cm}^2$ - liegen mehr oder weniger unter der Wachstumskurve 1, was dem verzögerten Tumorwachstum der unterschiedlich behandelten Tiere entspricht.

Vergleicht man die Zeit, in welcher die Tumoren die Masse 100 mg erreichen, so stellt man fest, dass dies

bei 1 - Behandlung mit 40 J/cm^2 - nach 2,5 Tagen,

bei 2 - Behandlung mit 60 J/cm^2 - nach 4,0 Tagen,

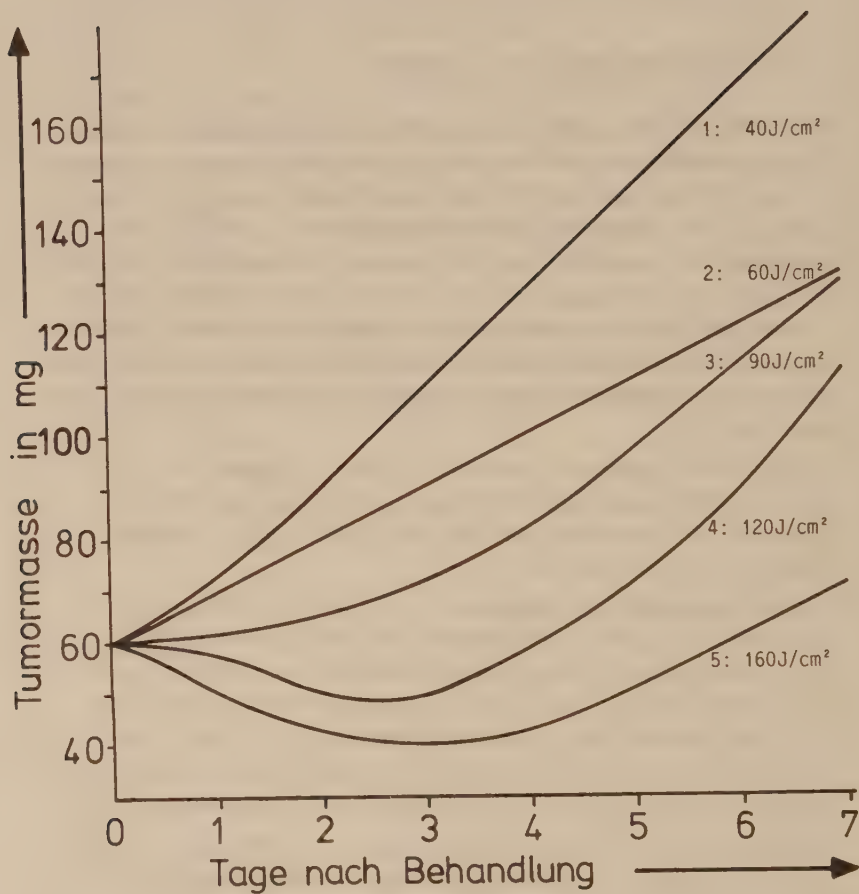


Abb. 15: Wachstumskurven des AT 51 nach Behandlung mit unterschiedlichen Lichtdosen (Leistungsdichte: 170 mW/cm²; Bestrahlungszeiten: 235 - 941 sec).

- bei 3 - Behandlung mit 90 J/cm^2 - nach 5,2 Tagen,
- bei 4 - Behandlung mit 120 J/cm^2 - nach 6,5 Tagen,
- bei 5 - Behandlung mit 160 J/cm^2 - nach 10,0 Tagen (in

Abb. 15 nicht dargestellt) der Fall ist. Da das Tumorstadium bei der Behandlung mit der Dosis 40 J/cm^2 dem Tumorstadium unbehandelter Tiere gleicht, kann die Meßkurve 1 zur Berechnung des Growth Delay (GD) bei den Kurven 2 - 5 verwendet werden (siehe Kap. 2.10.2). Bei 100 mg Tumormasse ergibt sich ein GD

- für 2 - Behandlung mit 60 J/cm^2 - von 1,5 Tagen,
- für 3 - Behandlung mit 90 J/cm^2 - von 2,7 Tagen,
- für 4 - Behandlung mit 120 J/cm^2 - von 4,0 Tagen,
- für 5 - Behandlung mit 160 J/cm^2 - von 7,5 Tagen.

Diese Werte verdeutlichen, daß mit steigender Dosis das Wachstum der Tumoren in entsprechend stärkerem Ausmaß behindert wird.

Bei den Wachstumskurven 2 und 3 mit einem relativ niedrigen GD von 1,5 und 2,7 Tagen ist zu befürchten, daß bei der Behandlung mit unterschiedlichen Leistungsdichten die Behandlungserfolge nur schlecht beurteilbar sein werden.

Aus einem GD von 7,5 Tagen bei der Wachstumskurve 5 ist zu erkennen, daß der Tumor sich nur langsam von der Photochemotherapie erholt. Bei größeren Tierzahlen würden einige Tumoren wahrscheinlich total regredieren und für die Messung ausfallen. Außerdem muß bei einer Dosis von 160 J/cm^2 sehr lange bestrahlt werden (bei 25 mW/cm^2 z.B. $1 \text{ h } 47'$), was bei größerer Tierzahl schwer durchführbar ist.

Daher fiel die Wahl auf die Lichtdosis von 120 J/cm^2 , die mit einem GD von 4,0 Tagen im mittleren Bereich der untersuchten Lichtdosen lag und daher als sehr geeignet erschien. Bei einer deutlichen Wachstumsverzögerung wurde hierbei der Tumor dennoch nicht nachhaltig geschädigt. Im Hauptversuch mit variabler Leistungsdichte (Kap. 3.5) wurde diese Dosis konstant gehalten.

3.2 Behandlung mit der Rotlampe

In Zusammenhang mit dem in Kap. 3.1 beschriebenen Versuch wurden zusätzlich zwei Tumoren mit dem Licht der Rotlampe (siehe 2.9.3) behandelt. Es sollte untersucht werden, ob die Rotlampe eine zum Farbstofflaser alternativ verwendbare Lichtquelle darstellt.

Die Tumoren der Wachstumskurven in Abb. 16 wurden folgendermaßen behandelt:

Kurve	Lichtquelle	Dosis in J/cm^2	Leistungsdichte in mW/cm^2	Bestrahlungszeit in sec
1	Laser 630nm	40	170	235
2	Laser 630nm	60	170	353
3	Rotl. 630nm	60	108	554
4	Rotl. 630nm (25 Hz)	60	108	1108

Da die Leistungsdichte des Laserlichtes $170 \text{ mW}/\text{cm}^2$, die der Rotlampe $108 \text{ mW}/\text{cm}^2$ betrug, ist die Wirksamkeit der Behandlung untereinander nur bedingt vergleichbar. Es handelte sich hierbei um einen orientierenden Versuch mit jeweils nur einem Versuchstier, was allgemein gültige Aussagen nicht zuläßt.

Unter diesem Vorbehalt ist jedoch festzustellen, daß durch die Behandlung mit der Rotlampe bei $60 \text{ J}/\text{cm}^2$ etwa ebenso große Wachstumsverzögerungen zu erzielen sind wie mit der Laserlichtbehandlung bei gleicher Dosis. Die Bestrahlung mit Lichtimpulsen (25 Hz) brachte bei der Rotlampe als Lichtquelle keine Veränderung in der Wachstumsverzögerung.

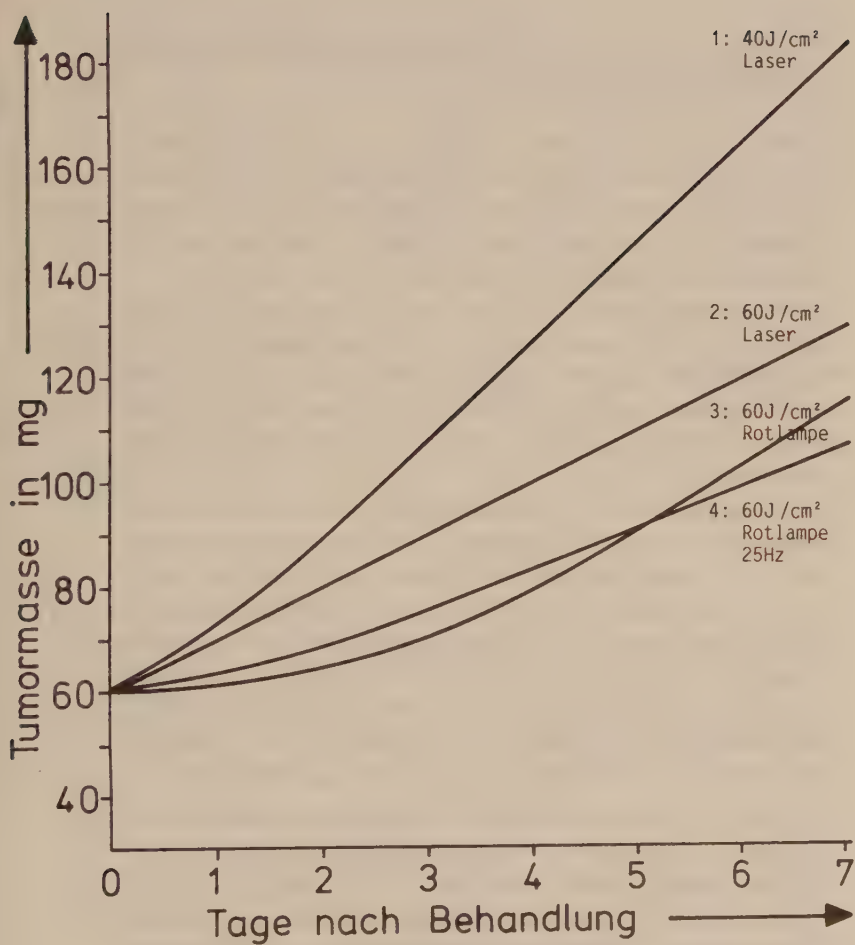


Abb. 16: Rotlichtbehandlung nach HpD-Gabe mit unterschiedlichen Lichtquellen.

3.3 Einfluß der Leistungsdichte des Rotlichtes auf das Tumorwachstum ohne Photosensibilisierung

Nachdem die geeignete Lichtdosis gefunden war (siehe 3.1), konnte die Wirkung unterschiedlicher Leistungsdichten auf das Tumorwachstum untersucht werden. Es wurden 7 Gruppen zu je 7 Tieren gebildet (siehe Kap 2.7). Eine Gruppe war die Kontrollgruppe ohne jede Behandlung. Sodann wurden drei Gruppen mit 75, 250 und 500 mW/cm² Leistungsdichte bestrahlt, nachdem sie 24 Stunden zuvor 10 mg HpD /kg KG injiziert bekommen hatten. Drei weitere Gruppen wurden auch mit 75, 250 und 500 mW/cm² behandelt, bekamen aber zuvor kein HpD. Letztere dienten ebenso der Kontrolle. Mit ihnen sollte untersucht werden, ob die Laserbehandlung allein eine wachstumshemmende Wirkung erzeugt.

Während des Versuches - die Gruppen waren noch nicht vollständig aufgefüllt - entstanden bei einem Teil der behandelten Versuchstiere großflächige und tief nekrotisierende Ulzera im Zentrum der Tumoren. Meist waren sie von einem Wall des noch verbleibenden tumorösen Gewebes umgeben. Die Ulzera entwickelten sich zwischen dem 2. und 5. Tag nach einer Behandlung. Da es bei diesen Tieren teils unmöglich war, die Tumormasse einigermaßen exakt zu bestimmen, wurde auf weiteres "Blindmessen" (siehe Kap. 2.6) verzichtet und nachgeprüft, welcher Behandlung diese Tiere zuzuordnen waren.

Es zeigte sich, daß solche Ulzera in den Gruppen vorkamen, die mit 250 mW/cm² und 500 mW/cm² Leistungsdichte behandelt worden waren. Erstaunlicherweise hatten sowohl Tiere, die HpD erhalten hatten, als auch solche ohne vorherige HpD-Gabe diese Ulzera. Die beiden Gruppen, die mit 75 mW/cm² behandelt worden waren, zeigten dagegen keine Oberflächendefekte.

In Abb. 17 sind die vier Kontrollgruppen dieses Versuches dargestellt. Keines der Tiere hatte HpD erhalten.

Verglichen mit der Kontrollgruppe ohne jede Behandlung zeigte sich bei den mit Licht behandelten Kontrollgruppen eine deutliche Wachstumsverzögerung in Abhängigkeit von der verwendeten Leistungsdichte.

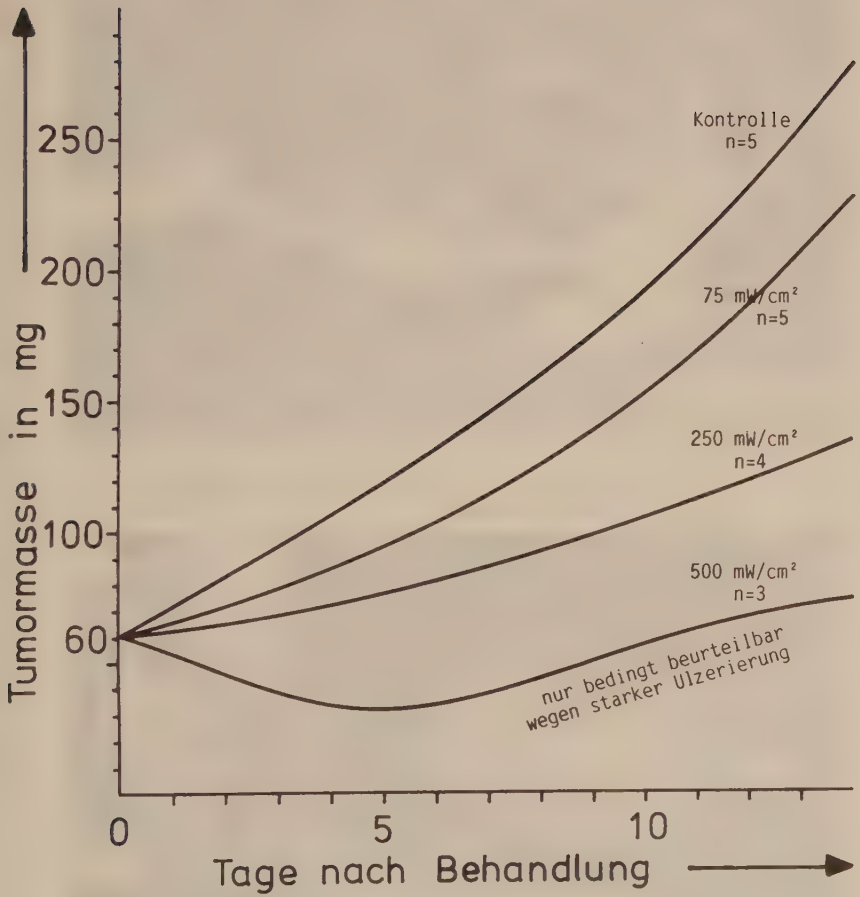


Abb. 17: Rotlichtbestrahlung mit unterschiedlichen Leistungsdichten ohne vorherige HpD-Gabe (Kontrolle: keine Behandlung).



Abb. 18: Tumor 14 Tage nach Behandlung mit Rotlicht (500 mW/cm^2 ; 120 J/cm^2 ; keine HpD-Gabe).

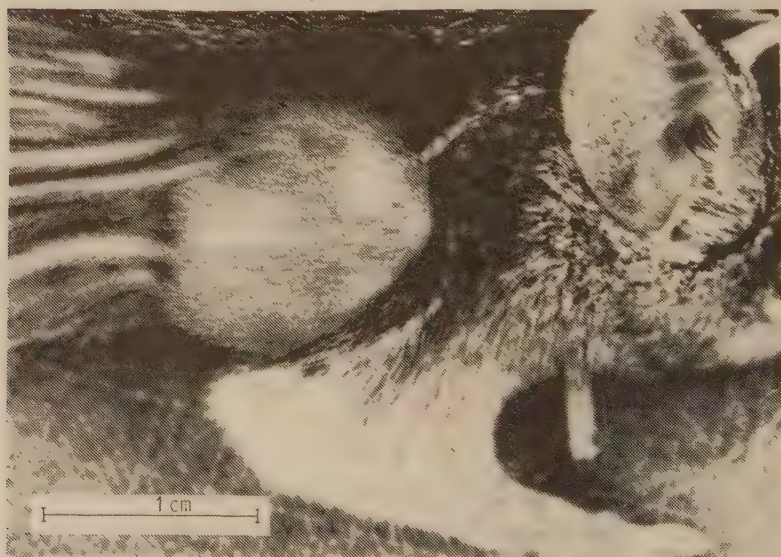


Abb. 19: Gleichalter Tumor wie in Abb. 18; ohne Rotlichtbehandlung.

Die Masse der Tumoren, die mit 500 mW/cm^2 behandelt worden waren, war mit der Schablone allein, wegen des Ausmaßes der Ulzera, nicht mehr zu bestimmen. Auch das zusätzliche Abschätzen der Defekte war schwierig (siehe Kap. 2.6). Die Aussage der Meßkurve in Abb. 17, daß diese Tiere im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen kaum über ihr Anfangsgewicht hinauswachsen, enthält daher ein subjektives Moment. Offensichtlich hatten jedoch die mit 500 mW/cm^2 Leistungsdichte behandelten Tumoren die größten Substanzdefekte.

Da die mit 250 mW/cm^2 behandelten Tumoren nur kleinere Ulzera aufwiesen, war deren Masse noch relativ gut bestimmbar. Auch die Meßkurve dieser Tumoren weist eine deutliche Wachstumshemmung auf.

Bemerkenswert ist, daß die Tumoren, die nur mit einer Leistungsdichte von 75 mW/cm^2 bestrahlt wurden, im Wachstum hinter der nicht behandelten Gruppe zurückblieben, obwohl sie keinerlei Oberflächendefekte aufwiesen.

Abb. 18 zeigt einen Tumor 14 Tage nach der Behandlung mit 500 mW/cm^2 Leistungsdichte ohne vorherige HpD-Gabe im Vergleich mit einem gleichalten Tumor der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 19).

Als Ursache für die wachstumshemmende und ulzerierende Wirkung der Lichtbehandlung ohne HpD wurde - wegen der auffallenden Abhängigkeit von der Leistungsdichte - ein Temperaturanstieg im Tumor während der Behandlung vermutet. Zur weiteren Untersuchung dieses Phänomens wurden Temperaturmessungen im Tumor unter Lichtbehandlung durchgeführt.

3.4 Ergebnisse der Temperaturmessung im Tumor

Die Temperaturmessung sollte unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden, die für die Behandlung der Tumoren bestimmt worden war. D. h. 24 Stunden nach Gabe von 10 mg HpD / kgKG (bzw. für die Kontrolltiere ohne HpD) wurden unterschiedliche Leistungsdichten an je einem Tier untersucht. Bei Tumormassen zwischen $60 - 100 \text{ mg}$ waren die Tumoren etwas größer als in dem in Kap. 3.3 beschriebenen Versuch.

Mit der Thermosonde (siehe Kap. 2.9.8) wurde in den Tumor eingestochen und die Spitze von Hand etwa im Zentrum des Tumors gehalten. Der alle 5 Sekunden abgelesene Meßwert wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Abb. 20 zeigt die Meßkurven von Tieren, die HpD erhalten haben. Nach einer mittleren Anfangstemperatur von etwas über 36°C (= Körpertemperatur der Tiere) ließ sich in allen Tumoren nach Beginn der Behandlung eine Temperaturerhöhung feststellen. Die Temperaturerhöhungen zeigten Abhängigkeit von der verwendeten Leistungsdichte, die zwischen 75 mW/cm^2 und 500 mW/cm^2 lag. Da im Anschluß an diesen Versuch keine Wachstumskurven der Tumoren erstellt werden sollten, wurde nicht solange bestrahlt, bis die Dosis von 120 J/cm^2 erreicht war, sondern lediglich bis kein weiterer Temperaturanstieg mehr festzustellen war (Maximaltemperatur: T_{max}). Bei der Leistungsdichte von 500 mW/cm^2 wurde z. B. eine Maximaltemperatur von $55,6^{\circ}\text{C}$ nach 120 Sekunden gemessen. Das entspricht einer Temperaturerhöhung von $19,6^{\circ}\text{C}$. Der mit 250 mW/cm^2 behandelte Tumor zeigte dagegen bei $45,2^{\circ}\text{C}$ keinen weiteren Temperaturanstieg mehr. Das entspricht nach 110 Sekunden einer Temperaturerhöhung von $9,2^{\circ}\text{C}$.

In einem zweiten Durchgang wurden die Temperaturen in Tumoren von Tieren gemessen, die zuvor kein HpD erhalten hatten. Es sollte geprüft werden, ob der zuvor gemessene Temperaturanstieg im Zusammenhang mit der HpD-Anreicherung im Tumorgewebe steht.

Die Meßkurven der mit 75 mW/cm^2 bis 417 mW/cm^2 Leistungsdichte behandelten Tiere sind in Abb. 21 dargestellt. Der mit 417 mW/cm^2 behandelte Tumor erreicht z. B. eine Maximaltemperatur von $49,4^{\circ}\text{C}$ nach 145 Sekunden und liegt damit um $3,2^{\circ}\text{C}$ höher als der entsprechende Tumor nach HpD-Gabe.

Zusätzlich wurde noch bei zwei Tieren ohne Tumor und ohne HpD-Gabe die Temperatur im subkutanen Gewebe gemessen. Es wurde dazu mit einer Leistungsdichte von 250 mW/cm^2 behandelt (Abb. 22).

Die Maximaltemperaturwerte aller oben beschriebenen Versuche sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

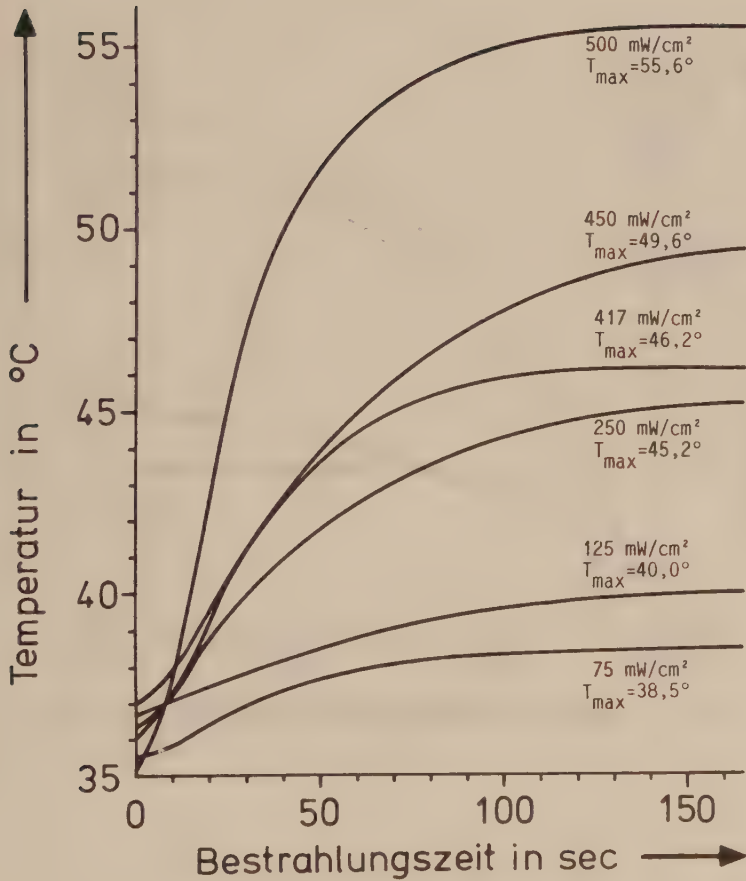


Abb. 20: Temperaturmessung in Tumoren während Rotlichtbestrahlung mit unterschiedlichen Leistungsdichten nach HpD-Gabe.

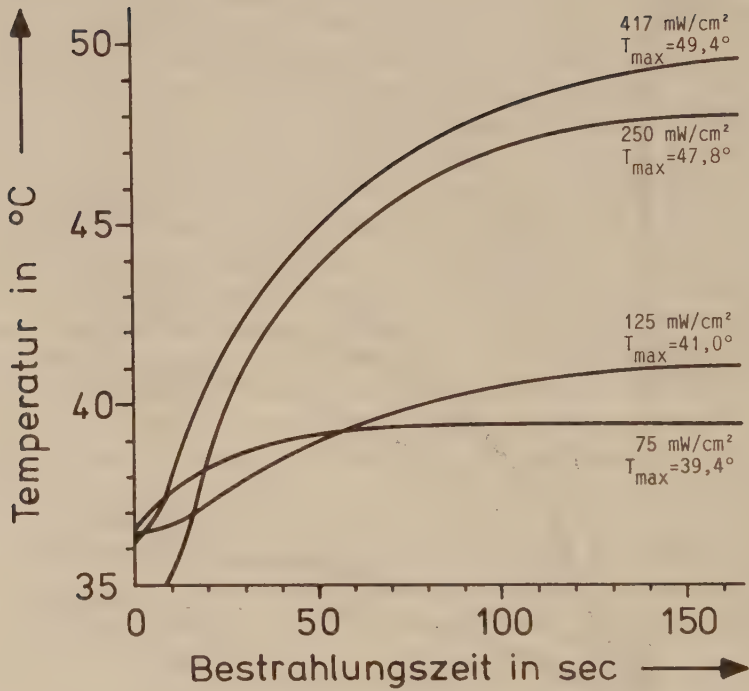


Abb. 21: Temperaturmessung in Tumoren während Rotlichtbestrahlung mit unterschiedlichen Leistungsdichten ohne vorherige HpD-Gabe.

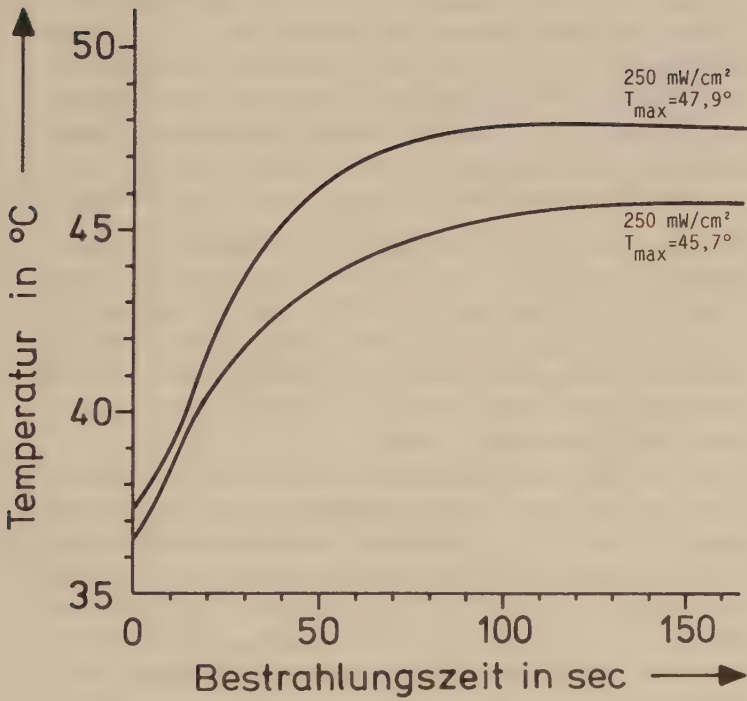


Abb. 22: Temperaturmessung im subkutanen Gewebe während Rotlichtbestrahlung mit der Leistungsdichte von 250 mW/cm^2 ; ohne HpD-Gabe.

Während der Versuche zeigte sich, daß es schwierig war, die Spitze der Thermosonde über mehrere Minuten exakt am gleichen Ort zu halten. Aus leichten Verschiebungen der Sonde im Gewebe resultierte ein mehr stufenweises Ansteigen der Meßwerte mit z. T. so starken Schwankungen, daß einige Tiere für die Auswertung des Versuches ausfielen. Durch diese Schwierigkeit konnte jedoch die Erfahrung gemacht werden, daß ein Temperaturgefälle innerhalb eines Tumors besteht. Bei allen untersuchten Tieren war im Zentrum des Tumors eine wesentlich höhere Temperatur zu messen als in der Peripherie.

Abb. 23 zeigt zwei mit der Leistungsdichte 450 mW/cm^2 behandelte Tumoren nach HpD-Gabe. Bei dem Tier der Kurve a) liegt die Sonde im Zentrum, bei dem der Kurve b) im äußeren Drittel des Tumors und wurde nach 95 Sekunden (Pfeil) in den Randbereich des Tumors zurückgezogen. Die Temperaturdifferenz der Messung zwischen Zentrum und äußerem Drittel betrug dabei 2°C , zwischen Zentrum und Peripherie $4,9^\circ\text{C}$ (gestrichelte Linien).

Als letztes sollte noch die Temperatur während der Behandlung bei zusätzlicher Kühlung der Tumoren untersucht werden. Hierzu wurde, sobald ein Tumor bei einer Behandlung einen konstanten Maximalwert erreicht hatte, Kochsalzlösung mit Raumtemperatur langsam auf den Tumor getropft (siehe Kap. 2.9.8). Die Temperatur der Tumoren sank daraufhin auf Werte die etwa den Anfangstemperaturen (ca. 36°C) entsprachen. Wurde die Kühlung von Beginn einer Behandlung an durchgeführt, so konnte ein Temperaturanstieg nahezu vollständig verhindert werden.

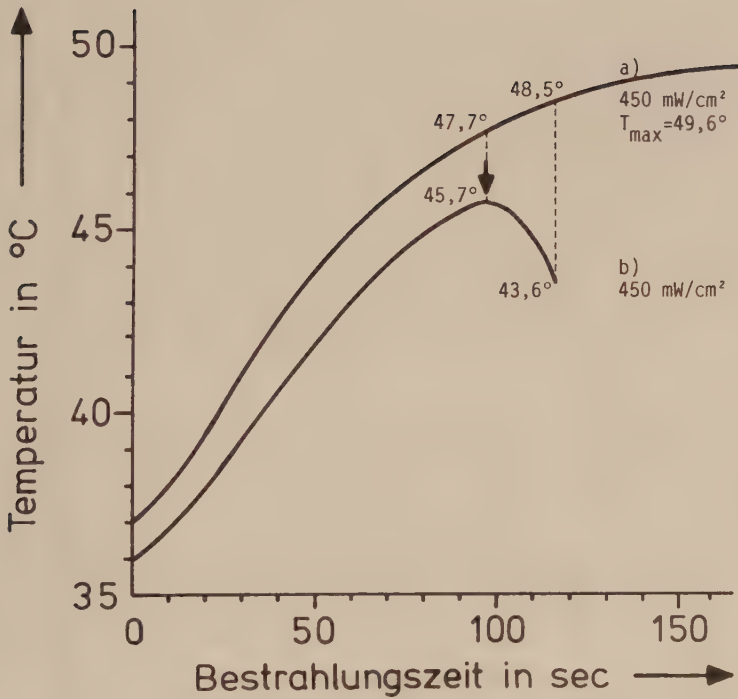


Abb. 23: Temperaturmessung in zwei Tumoren während Rotlichtbestrahlung mit der Leistungsdichte 450 mW/cm^2 ; nach HpD-Gabe:
a) Im Zentrum des Tumors
b) Im äußeren Drittel des Tumors; bei $\longrightarrow$ Zurückziehen der Sonde in den Randbereich.

Leistungs- dichte [mW/cm ²].	Max. Tempera- tur = T _{max} [°C]	Zeit bis zum Er- reichen von T _{max} [sec]	Max. Tempera- tur = T _{max} [°C]	Zeit bis zum Er- reichen von T _{max} [sec]	Max. Tempera- tur = T _{max} [°C]	Zeit bis zum Er- reichen von T _{max} [sec]
	nach Gabe von HpD		ohne Gabe von HpD		subkutan, ohne Gabe von HpD	
75	39,4	85	38,5	130	—	—
125	41,0	150	40,0	135	—	—
250	47,8	135	45,2	150	45,7 47,1	90 120
417	49,4	160	46,2	110	—	—
450	—	—	49,6	150	—	—
500	—	—	55,6	120	—	—

Tab. 2: Zusammenfassung der Maximaltemperaturwerte der Temperaturmessungen im Tumor und subkutan.

3.5 Photodestruierende Effekte von HpD bei Verwendung von Licht unterschiedlicher Leistungsdichten

Die im Kap. 3.3 begonnene Untersuchung zur Wirksamkeit unterschiedlicher Leistungsdichten in der Photochemotherapie mit HpD mußte wegen des Auftretens großflächiger und tiefer Ulzera der Tumoren abgebrochen werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Kap. 3.4 wurde diese Untersuchung jedoch wieder aufgenommen. Dabei wurde, um ulzerierende Defekte der Tumoren zu vermeiden, auf die Behandlungsgruppe mit der Leistungsdichte 500 mW/cm^2 verzichtet. Des weiteren wurden alle Tumoren während der Behandlung gekühlt (siehe 2.9.8). Die Lichtdosis von 120 J/cm^2 wurde beibehalten, ebenfalls die HpD-Dosis 10 mg / kgKG 24 Stunden vor der Behandlung. Folgende Gruppen wurden gebildet (Tab. 3).

3.5.1 Ergebnisse zur Untersuchung der Verteilung der Meßwerte

Für die Gruppen 11 - 16 wurde getrennt und für jeden Meßtag die Art der Verteilung der Meßwerte untersucht (Skewnesswert) und die Tage mit "annähernder Normalverteilung" sowie mit "nicht-Normalverteilung" ausgezählt (siehe Kap. 2.10.3.1). Die Skewnesswerte sind in den Tabellen des Anhangs dargestellt; die Auswertung ist in Tab. 4 zusammengefaßt.

Aus Tab. 4 wird ersichtlich, daß im Mittel nur bei 28 % der gemessenen Tage die Werte einer Normalverteilung folgen. Dabei hat die Gruppe 11 keine, die Gruppe 15 zu 43 % Meßtage mit normalverteilten Meßwerten. Die Verteilungskurven der normalverteilten Meßwerte entsprechen etwa der im Histogramm Abb. 11 dargestellten Kurve. Die Verteilungskurven der nicht normal verteilten Meßwerte entsprechen weitgehend der im Histogramm Abb. 12 dargestellten Kurve oder weichen teilweise noch stärker von einer ideal symmetrischen Verteilungskurve ab.

Gruppe Nr.	Funktion und Kurzbezeich- nung der Grp.	HpD-Gabe 10 mg/ kgKG	Rotlichtbestrahlung 630 nm	
			Dosis [J/cm ²]	Leistungsdichte [mW/cm ²]
11	Kontrolle ohne Behand- lung(KTROBEH)	—	—	—
12	Kontrolle Lichtbehand- lung(KTR 250)	—	120	250
13	Kontrolle Lichtbehand- lung(KTR 75)	—	120	75
14	Behandlungs- gruppe (BEH 250)	+	120	250
15	Behandlungs- gruppe (BEH 75)	+	120	75
16	Behandlungs- gruppe (BEH 25)	+	120	25

Tab. 3: Gruppeneinteilung für die Untersuchung von unterschiedlichen Leistungsdichten in der Photochemotherapie mit HpD.

Gruppe Nr.	Anzahl der Meßtage ei- ner Gruppe	auswert- bare Meß- tage	Normal- verteilung		nicht-Normalver- teilung	
			[Tage]	in %	[Tage]	in %
11	23	10	—	—	10	100
12	23	23	6	26	17	74
13	23	23	7	30	16	70
14	21	21	5	24	16	76
15	23	23	10	43	13	57
16	23	23	6	26	17	74
gesamt	136	123	34	28	89	72

Tab. 4: Art der Verteilung der Meßwerte; Auswertung der Ergebnisse.

3.5.2 Ergebnisse der Regressionsanalyse

In der Regressionsanalyse wurde die "Güte" der Meßkurven der Tiere innerhalb einer Behandlungsgruppe untersucht (siehe Kap. 2.10.3.2). Ebenfalls wurde diese Untersuchung für die natürlichen Logarithmen der Meßwerte dieser Kurven durchgeführt. Wegen eines direkt nach der Behandlung auftretenden Ödems wurden die Meßwerte erst ab dem 4. Tag nach der Behandlung vom Großbrechner ausgewertet.

Tab. 5 faßt die Ergebnisse zusammen:

Grp.	für Meßwerte linear		für Meßwerte logarithmiert	
	Korrelations- koeffizient	Signifikanz	Korrelations- koeffizient	Signifikanz
11	0,95327	0,0000	0,95786	0,0000
12	0,88815	0,0000	0,94441	0,0000
13	0,89165	0,0000	0,95480	0,0000
14	0,70924	0,0000	0,68692	0,0000
15	0,64567	0,0000	0,64382	0,0000
16	0,72510	0,0000	0,77603	0,0000

Tab. 5: Ergebnisse der Regressionsanalyse für die Gruppen 11 - 16.

Für die Wachstumskurven aller Gruppen 11 - 16 sowie für deren Logarithmus ergeben sich in der Regressionsanalyse hoch signifikante Werte. Das bedeutet, die Wachstumskurven innerhalb einer Gruppe sind sich in hohem Maße ähnlich, die statistische Wahrscheinlichkeit, daß die 0-Hypothese zutrifft, ist gleich 0,0000.

Vergleicht man innerhalb der Gruppen die Korrelationskoeffizienten der linearen und der logarithmischen Auswertung, so stellt man fest, daß diese bis auf Gruppe 14 und 16 für die logarithmische Auswertung größer sind.

Vergleicht man die "Güte" der Meßkurven der Gruppen untereinander, so ergibt sich folgende Reihenfolge für lineare wie auch für logarithmierte Kurven:

Grp. 11 besser Grp. 13. besser Grp. 12 besser Grp. 16 besser Grp. 14 besser Grp. 15.

3.5.3 Ergebnisse zur Wirksamkeit unterschiedlicher Leistungsdichten in der Photochemotherapie mit HpD

Mit dem Programm für multiple Regressionen (BMDP₈₃; 1R) wurden die Wachstumskurven der unterschiedlichen Behandlungsgruppen auf ihre Abweichungen untereinander untersucht (siehe Kap. 2.10.3.3.). Die Ergebnisse machen eine Beurteilung der Wirksamkeit der verschiedenen Behandlungen möglich.

Die Beziehung verschiedener Behandlungsgruppen zueinander ist im folgenden durch eine Abbildung der jeweils untersuchten Wachstumskurven und der Growth Delay-Kurven dargestellt; die

- Signifikanzwerte,
- Werte der F-Statistik,
- Freiheitsgrade zwischen den Gruppen (erster Wert),
- Freiheitsgrade innerhalb einer Gruppe (zweiter Wert),
- Growth Delay-Werte bei 300 mg (GD₃₀₀)

werden dazu tabellarisch angegeben. (Abgekürzte Bezeichnung der Gruppen siehe Tab. 3).

Die Abb. 24 gibt eine Übersicht über die Wachstumskurven der Gruppen 11 - 16. Auf die Darstellung des Standardfehlers der Meßwerte wurde verzichtet. Eingezeichnet ist der vorübergehende Meßwertanstieg durch eine Ödematisierung der Haut (gestricheltes Rechteck a), die direkt nach der Behandlung bei den Gruppen 14, 15 und 16 einsetzte. Da diese Werte den tatsächlichen Massezuwachs der Tumoren verfälschen, beginnt die statistische Auswertung erst mit dem 5. Tag nach Behandlung. In den folgenden Ausschnittdarstellungen aus Abb. 24 ist der Bereich a) der Kurven bei den Gruppen 14, 15 und 16 zu stetig ansteigenden Verläufen interpoliert.

Das gestrichelte Rechteck b) zeigt den Bereich bis 300 mg, aus dem die folgenden Growth Delay-Kurven errechnet wurden.

Die BMDP₈₃ - Statistik beginnt mit der Untersuchung der Gesamtheit der Wachstumskurven (Gruppe 11 - 16: jede gegen jede). Danach folgt die Untersuchung der Beziehung je zweier Wachstumskurvenverläufe zueinander.

<u>BMDP₈₃ - Ergebnisse</u>	Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz
Gruppe 11 - 16 jede gegen jede	10 und 722	45,792	0,00000

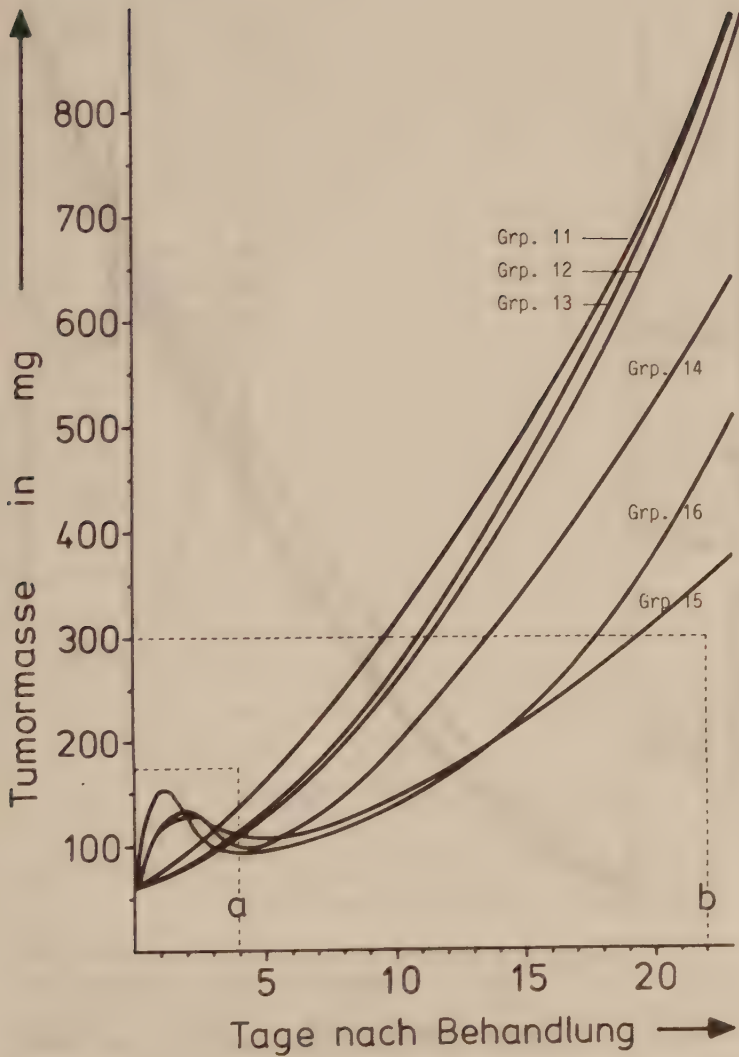


Abb. 24: Behandlung mit unterschiedlichen Leistungsdichten. Übersicht der Wachstumskurven der Gruppen 11 - 16. Gestricheltes Rechteck a) und b) siehe Text.

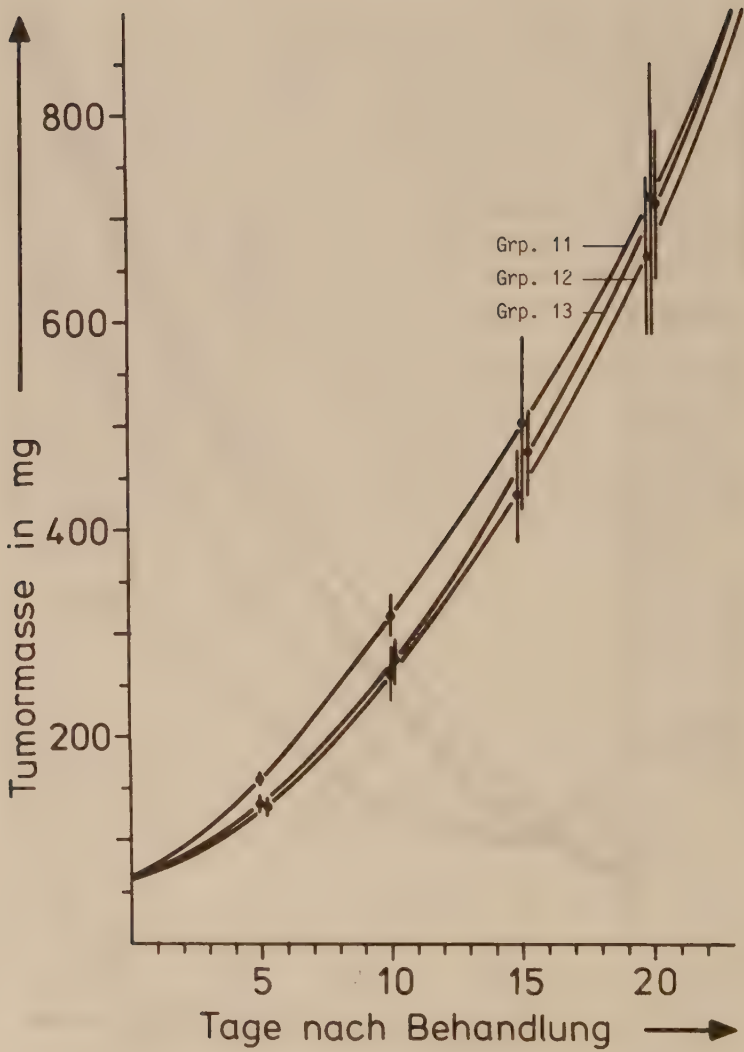


Abb. 25: Wachstumskurven der Kontrollgruppen: Grp. 11 (KTROBEH)
Grp. 12 (KTR 250)
Grp. 13 (KTR 75)

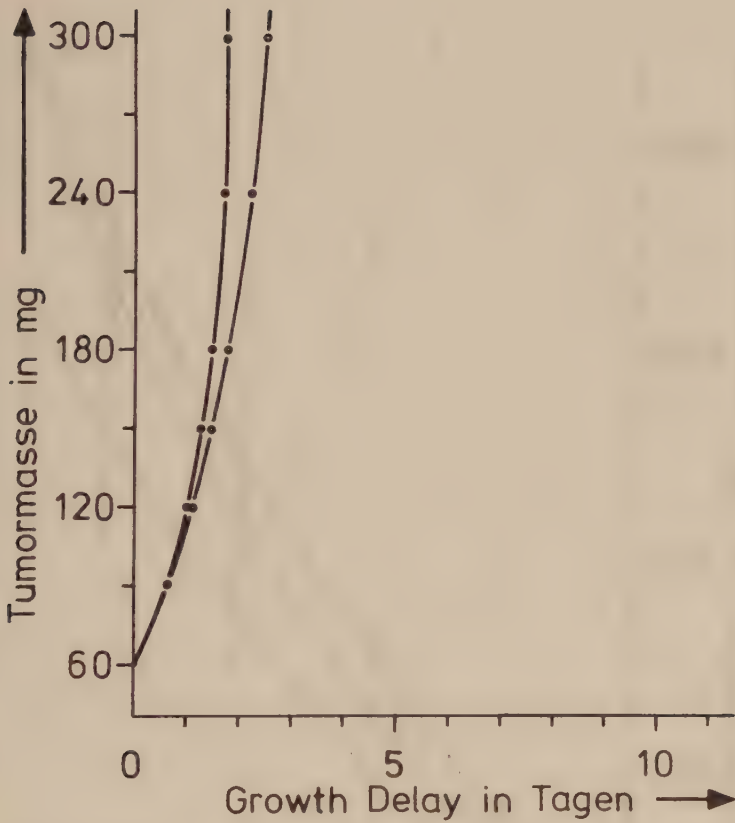


Abb. 26: Growth Delay: (•) Gruppe 12 zu Gruppe 11; $GD_{300} = 2,7$ d
(•) Gruppe 13 zu Gruppe 11; $GD_{300} = 2,1$ d

BMDP ₈₃ - Ergebnisse	Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz
Grp. 12 versus Grp. 11	2 und 217	7,469	0,00073
Grp. 13 versus Grp. 11	2 und 217	5,641	0,00409
Grp. 12 versus Grp. 13	2 und 258	0,301	0,74033

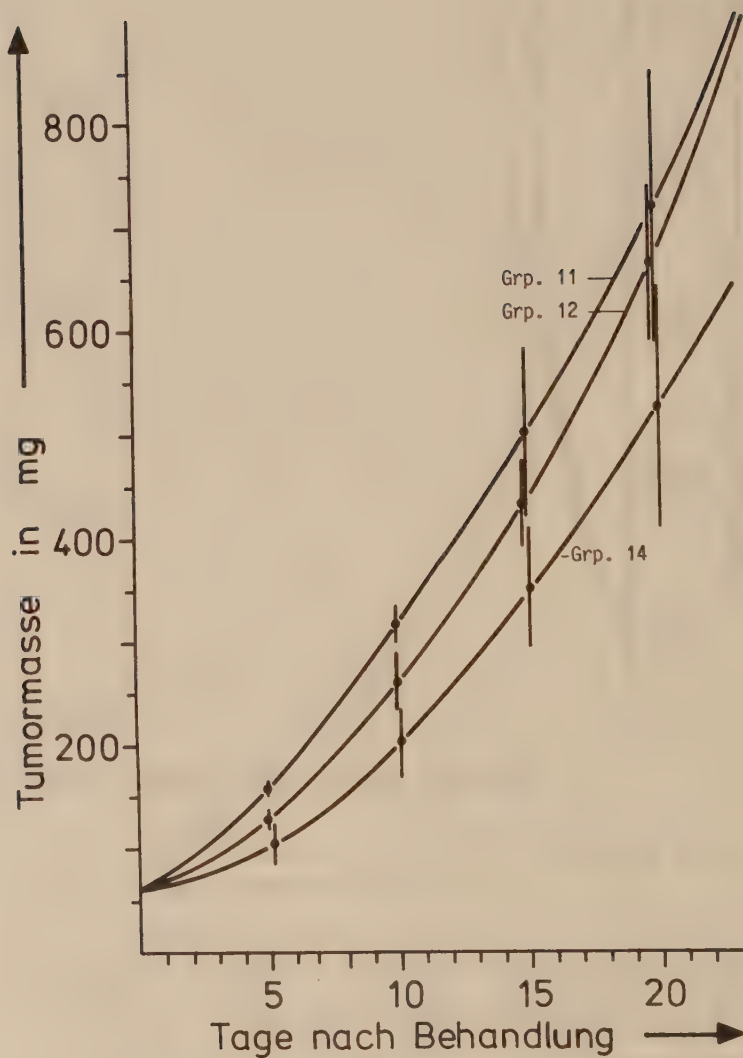


Abb. 27: Wachstumskurven der Behandlungsgruppe: Grp. 14 (BEH 250)
und ihrer Kontrollgruppen: Grp. 12 (KTR 250)
Grp. 11 (KTR0BEH)

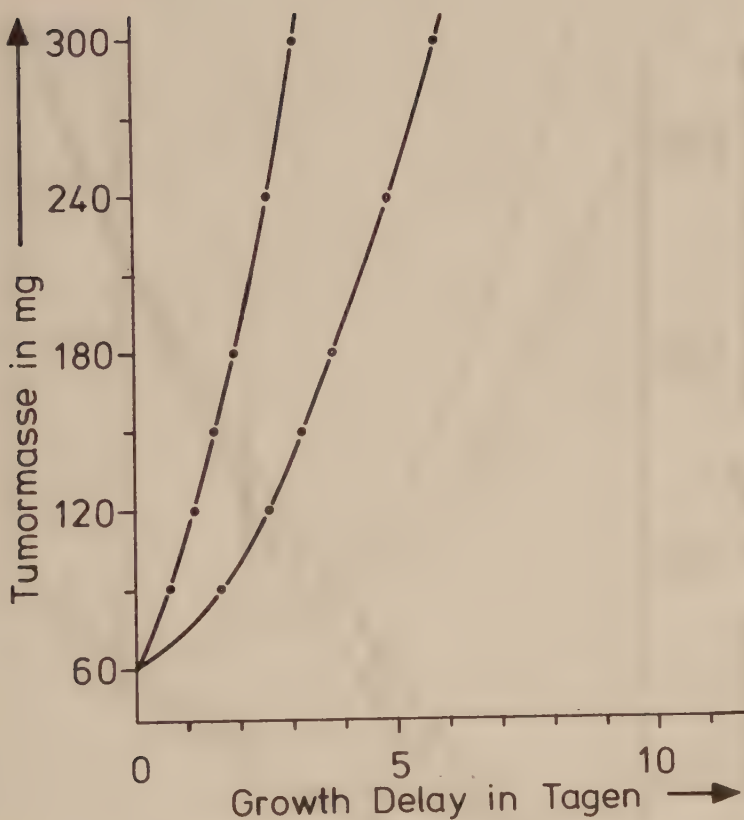


Abb. 28: Growth Delay: (●) Gruppe 14 zu Gruppe 12; $GD_{300} = 3,1$ d
(●) Gruppe 14 zu Gruppe 11; $GD_{300} = 5,8$ d

BMDP ₈₃ - Ergebnisse	Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz
Grp. 14 versus Grp. 12	2 und 243	20,934	0,00000
Grp. 14 versus Grp. 11	2 und 202	43,644	0,00000

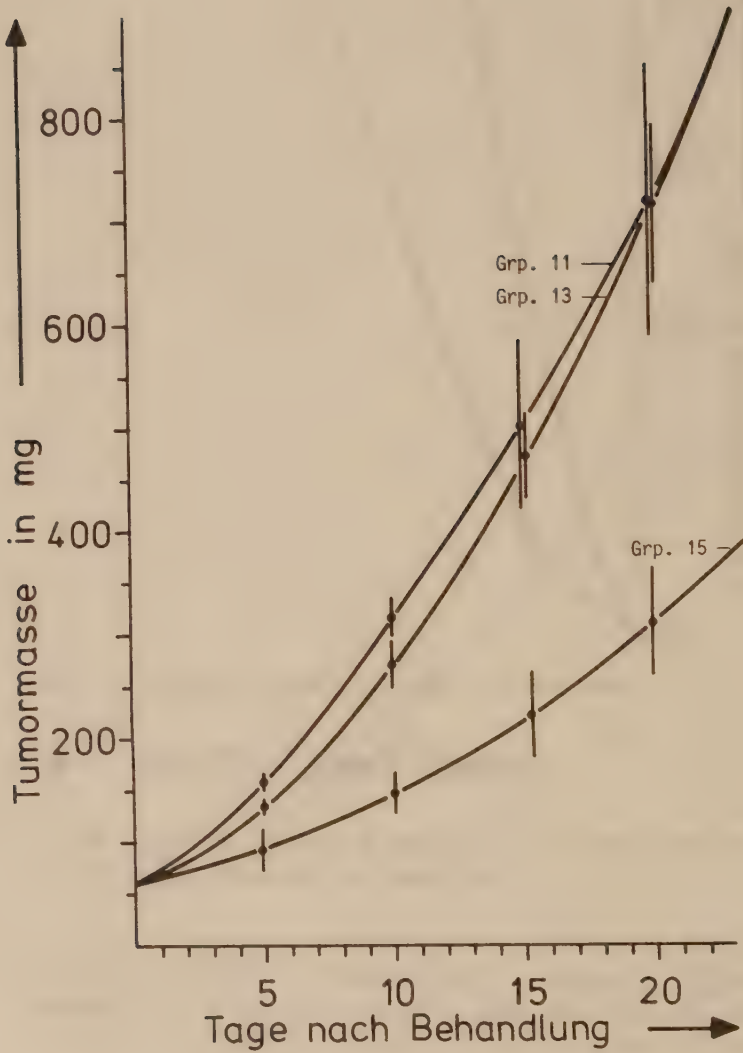


Abb. 29: Wachstumskurven der Behandlungsgruppe: Grp. 15 (BEH 75)
und ihrer Kontrollgruppen: Grp. 13 (KTR 75)
Grp. 11 (KTROBEH)

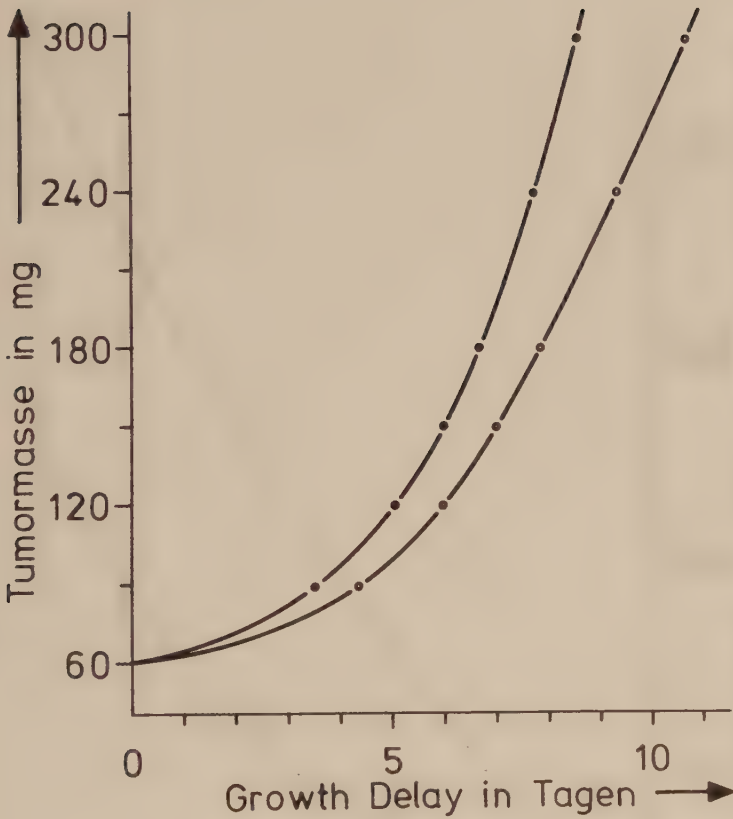


Abb. 30: Growth Delay: (●) Gruppe 15 zu Gruppe 13; $GD_{300} = 8,6$ d
(●) Gruppe 15 zu Gruppe 11; $GD_{300} = 10,7$ d

BMDP ₈₃ - Ergebnisse	Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz
Grp. 15 versus Grp. 13	2 und 260	94,602	0,00000
Grp. 15 versus Grp. 11	2 und 219	197,843	0,00000

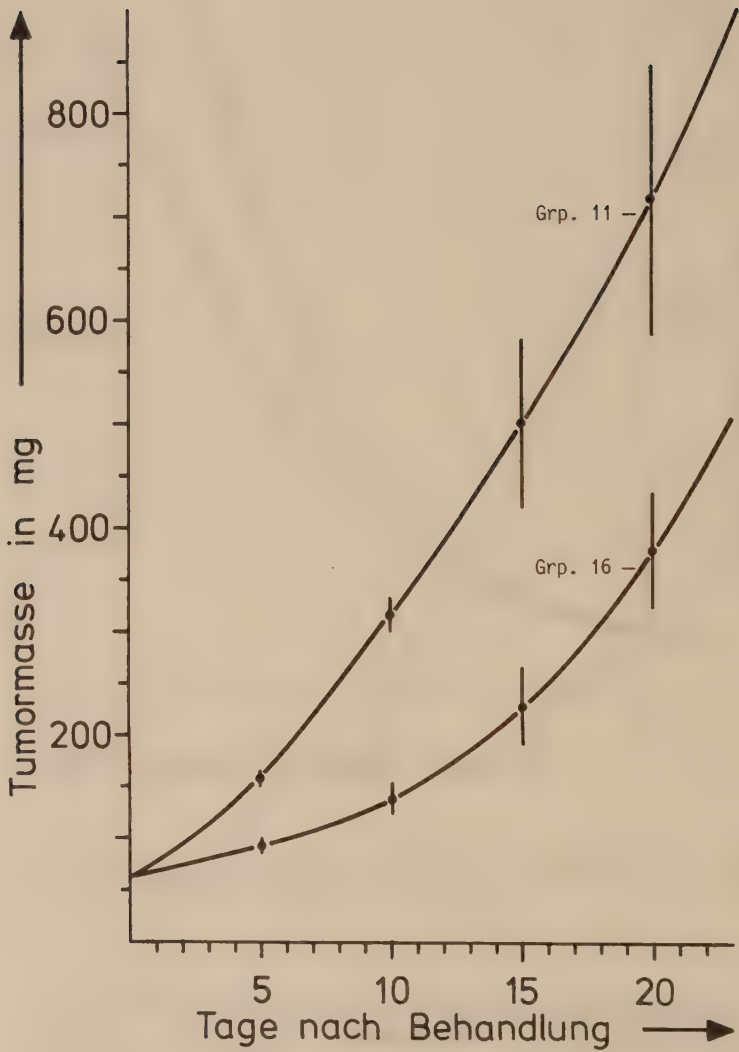


Abb. 31: Wachstumskurve der Behandlungsgruppe: Grp. 16 (BEH 25) und der Kontrollgruppe: Grp. 11 (KTR0BEH)

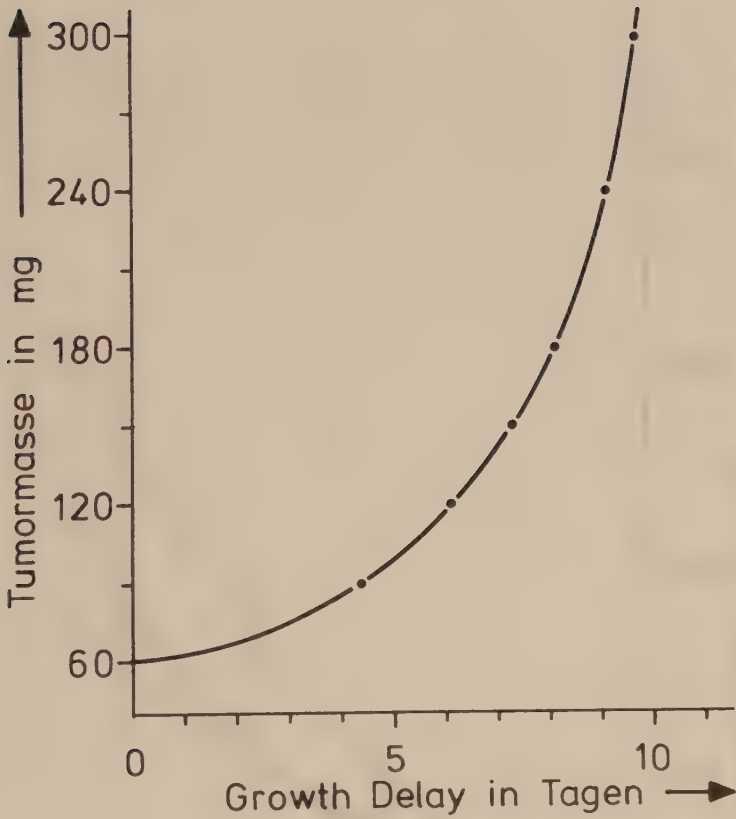


Abb. 32: Growth Delay: der Gruppe 16 zu Gruppe 11; $GD_{300} = 9,7$ d

BMDP ₈₃ - Ergebnisse		Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz
Grp. 16 versus Grp. 11		2 und 219	141,853	0,00000

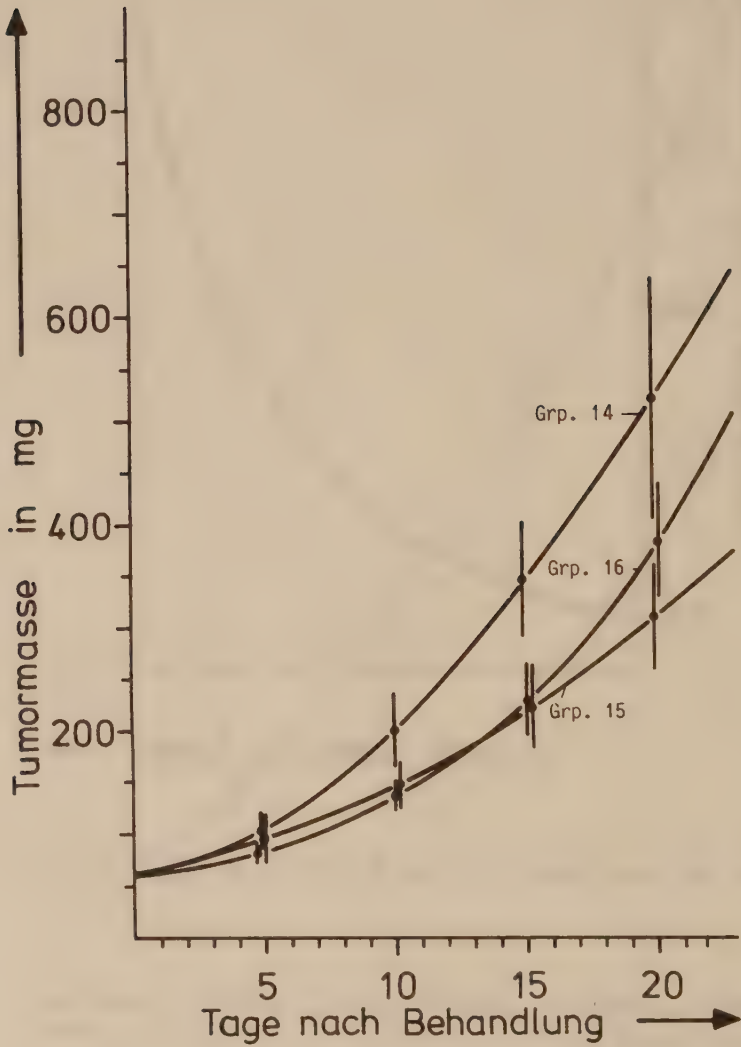


Abb. 33: Wachstumskurven der Behandlungsgruppen: Grp. 14 (BEH 250)
Grp. 15 (BEH 75)
Grp. 16 (BEH 25)

<u>BMDP₈₃ - Ergebnisse</u>	Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz
Grp. 14 versus Grp. 15	2 und 245	19,233	0,00000
Grp. 14 versus Grp. 16	2 und 245	8,474	0,00028
Grp. 15 versus Grp. 16	2 und 262	6,936	0,00113

Grp. Nr.	Kurz-bezeichnung	gegen	Grp. Nr.	Kurz-bezeichnung	Freiheitsgrade	F-Statistik	Signifikanz	dargestellt in Abb.
jede	Gruppe	gegen	jede	Gruppe	10 und 722	45,792	0,00000(**)	24
12	(KTR 250)	versus	11	(KTR08EH)	2 und 217	7,469	0,00073	25; 26
13	(KTR 75)	versus	11	(KTR08EH)	2 und 217	5,641	0,00409	25; 26
12	(KTR 250)	versus	13	(KTR 75)	2 und 258	0,301	0,74033	25; 26
14	(BEH 250)	versus	12	(KTR 250)	2 und 243	20,934	0,00000(**)	27; 28
14	(BEH 250)	versus	11	(KTR08EH)	2 und 202	43,644	0,00000(**)	27; 28
15	(BEH 75)	versus	13	(KTR 75)	2 und 260	94,602	0,00000(**)	29; 30
15	(BEH 75)	versus	11	(KTR08EH)	2 und 219	197,843	0,00000(**)	29; 30
16	(BEH 25)	versus	11	(KTR08EH)	2 und 219	141,853	0,00000(**)	31; 32
14	(BEH 250)	versus	15	(BEH 75)	2 und 245	19,233	0,00000(**)	33
14	(BEH 250)	versus	16	(BEH 25)	2 und 245	8,474	0,00028(*)	33
15	(BEH 75)	versus	16	(BEH 25)	2 und 262	6,936	0,00113	33

Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse aller in der BMDP83 - Statistik durchgeführten Untersuchungen

(** = hoch signifikant; * = signifikant; vgl. Kap. 2.10.3.2)

3.6 Untersuchung der Nebenwirkungen der Photochemotherapie mit HpD an der Haut

Unter Kühlung der behandelten Tumoren wurden keinerlei Nebenwirkungen an der Haut mehr beobachtet.

Um den phototoxischen Effekt an der Haut darzustellen, wurde versucht, Hautreaktionen durch die Photochemotherapie mit HpD zu provozieren. Dazu wurde bei je einem Versuchstier ein Hautareal von 11mm im Durchmesser mit einer Lichtdosis zwischen 50 und 500 J/cm² bestrahlt. Die konstante Leistungsdichte von 250 mW/cm² entsprach dabei der höchsten Leistungsdichte, die in dem in Kap. 3.5 beschriebenen Versuch verwendet wurde. Nachdem die Tiere täglich auf Hautveränderungen untersucht wurden, wurde am 4. Tag eine Gewebprobe aus dem bestrahlten Bereich entnommen und histologisch untersucht. Die Hautveränderungen werden im folgenden einzeln für jede der unterschiedlichen Lichtdosen dargestellt.

Dosis : 50 J/cm²

Leistungsdichte : 250 mW/cm²

Bestrahlungszeit: 200 sec

Hautbefund: Makroskopisch sieht man keine phototoxischen Veränderungen der Haut.

Histologie (Abb. 34): Das histologische Präparat am 4. Tag zeigt das Bild einer unveränderten tierspezifischen Epidermis.

Dosis : 100 J/cm²

Leistungsdichte : 250 mW/cm²

Bestrahlungszeit: 400 sec

Hautbefund: Es zeigt sich am ersten Tag ein scharf umschriebenes Ödem der Haut. Dieses bildet sich auch bis zum 4. Tag nicht völlig zurück. Die Hautfarbe ist zuerst fahl-grau und dabei deutlich blässer als die umgebende, nicht bestrahlte Haut. Der Farbunterschied bildet sich jedoch schon am 2. Tag zurück. Hautoberflächendefekte werden nicht beobachtet.

Histologie (Abb. 35): Die Epidermis zeigt fokale Zeichen einer milden phototoxischen Reaktion. Leicht ektatische Gefäße weisen auf die Entzündung der Haut hin. Ganz vereinzelt finden sich "sunburn cells" (siehe Pfeil).

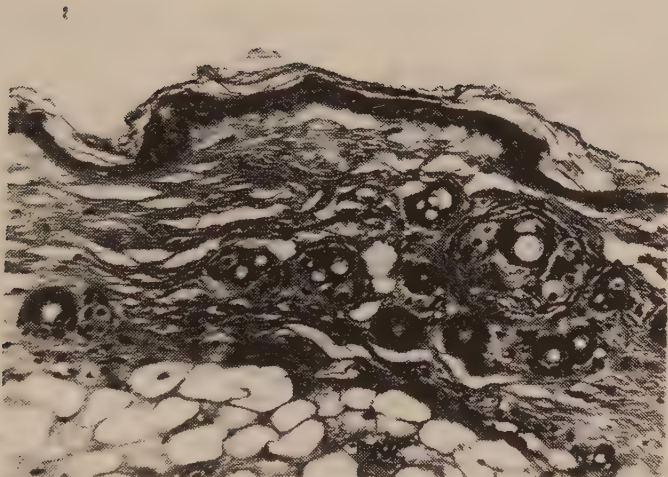


Abb. 34



Abb. 35

Dosis : 300 J/cm²

Leistungsdichte : 250 mW/cm²

Bestrahlungszeit: 1200 sec

Hautbefund: Mit etwas Verzögerung tritt auch hier ein scharf umschriebenes Ödem der Haut auf, welches seine stärkste Ausprägung am 2. und 3. Tag erreicht. Zusätzlich ist aber am 3. Tag ein Erythem zu beobachten. Im Zentrum flacht das Ödem gegen Ende des 3. Tages wieder ab. An dieser Stelle bildet sich am nächsten Tag dann ein Verschorfungsherd von ca. 1 cm im Durchmesser, der nunmehr von einem ringförmigen Ödem umgeben ist.

Histologie (Abb. 36): Die Epidermis ist weitgehend abgelöst, Reste zeigen eine typische phototoxische Reaktion mit sunburn cells. Das Korium ist in ganzer Breite koaguliert, randwärts sieht man einen Demarkationsbereich mit zahlreichen neutrophilen Leukozyten. Die Gefäße in der Tiefe sind thrombotisch verschlossen.

Dosis : 500 J/cm²

Leistungsdichte : 250 mW/cm²

Bestrahlungszeit: 2000 sec

Hautbefund: Auf einem im Vergleich mit oben beschriebenen Hautbefunden wesentlich stärkeren Ödem tritt hier keinerlei Erythem mehr auf. Die Haut erscheint fahl-blaß im bestrahlten Bereich. Am 3. Tag bildet sich im Zentrum des Ödems eine hämorrhagische Kruste, die sich bis zum 4. Tag zu einer 1 cm im Durchmesser großen, kompakten Nekrose entwickelt.

Histologie (Abb. 37): Die Epidermis und das Korium sind vollständig koaguliert. Insgesamt findet sich das Bild einer destruierten Haut. Korium ist völlig koaguliert. Insgesamt findet sich das Bild einer destruierten Haut.

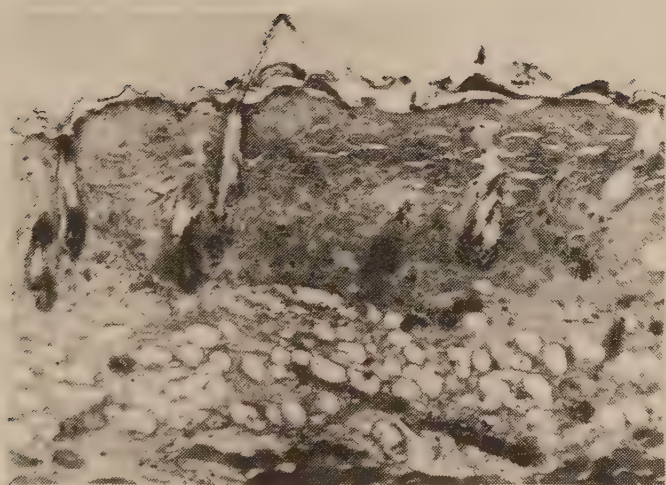


Abb. 36



Abb. 37

4 DISKUSSION

Schon Tappeiner erkannte im Jahre 1900 die phototoxische Wirkung bestimmter Substanzen^{118, 133} und versuchte, diesen Effekt zur Behandlung dermatologischer Erkrankungen zu nutzen¹³⁴. Bemerkenswert ist, daß dabei auch tumoröse Erkrankungen, wie Ulcus rodens und Hautkarzinome, waren. Trotz ermutigender Ergebnisse wurden bald keine weiteren Versuche mehr in dieser Richtung unternommen. Die Idee, tumoröse Erkrankungen durch Ausnutzung phototoxischer Reaktionen zu behandeln, geriet für über 70 Jahre in Vergessenheit^{12, 29}. Der Grund dafür war die Verbesserung weit wirkungsvollerer Methoden; chirurgische Techniken standen und stehen dabei an erster Stelle.

Das neuerliche starke Interesse, Tumoren photochemisch zu behandeln, entwickelte sich erst, nachdem einige wichtige Voraussetzungen gegeben waren, die eine effektive Photochemotherapie möglich erscheinen ließen:

- Die Entdeckung einer tumorselektiven und stark photosensibilisierenden Substanz, dem Hämatoporphyrin-Derivat,
- die Beherrschung endoskopischer Techniken, die erst die Möglichkeit schafften, Lichtenergie in eine Reihe von Organen zu leiten,
- die Entwicklung genügend starker Lichtquellen (Farbstofflaser).

Obwohl der Mangel an geeigneten, starken Lichtquellen einer der Gründe für den späten Entwicklungsbeginn der Photochemotherapie mit HpD gewesen sein dürfte, wurde die Bedeutung der Leistungsdichte des Lichtes auf die Wirkung der Therapie nie systematisch untersucht.

In der Literatur findet man daher sehr unterschiedliche Angaben über die verwendeten Leistungsdichten. Hohe Werte liegen bei 350 - 600 mW/cm²^{72, 73, 96}, niedrige bei 30 - 50 mW/cm²^{39, 115}. Die am häufigsten verwendeten Leistungsdichten sind im Bereich von 100 - 200 mW/cm² zu finden; oft werden die Leistungsdichten in der Literatur auch gar nicht angegeben, vielleicht weil man ihnen keine wesentliche Bedeutung für die Therapie zuschrieb³⁸.

Gerade in der Dermatologie ist die Photochemotherapie mit HpD ohne

Zusatzapparaturen, wie z. B. Endoskope, anwendbar. Dies bedeutet, daß man freier als in anderen medizinischen Disziplinen, wie Pulmologie, Gastroenterologie oder Urologie, die Leistungsdichte, die Lichtdosis und die Bestrahlungszeit nach dem Gesichtspunkt der Therapieoptimierung auswählen kann. Je nach Bedarf ist es z. B. möglich, kleine Areale mit Licht hoher Leistungsdichte oder aber große mit Licht niedrigerer Leistungsdichte zu bestrahlen, um damit die Behandlungsergebnisse zu verbessern. Auch der Wahl der Bestrahlungszeit sind in der Dermatologie nicht so enge Grenzen gesetzt, wie bei der Behandlung von Tumoren im Körperinnern.

Will man jedoch die Effektivität der Photochemotherapie mit HpD durch die bestmögliche Kombination der einzelnen Bestrahlungsparameter erhöhen, so ist es unabdingbar, deren Bedeutung für die Wirkung der Behandlung genau zu kennen.

4.1 Aus der Literatur entnommene Behandlungsparameter

Zum besseren Verständnis des Versuchaufbaus wurde auf die Wirkungsweise von HpD schon im Kap. 2.1 ausführlich eingegangen. Dort ist auch dargestellt, weshalb Licht mit der Wellenlänge 630 nm verwendet wurde. Der Wellenlängenbereich um 630 nm ist allgemein anerkannt der optimale Bereich für die Lichtbestrahlung in der Photochemotherapie mit HpD bei Behandlung von Gewebe größerer Dicke^{33, 37, 86, 115}.

An dieser Stelle soll noch auf einige andere Behandlungsgrößen des Versuchs eingegangen werden, die entweder aus der Literatur entnommen oder nach Literaturangaben modifiziert wurden.

HpD-Dosis:

Angaben über die HpD-Dosis sind für eine Vielzahl von Versuchstierarten und für den Menschen in der Literatur dargestellt. Sie liegen meist zwischen 2 - 5 mg/kgKG beim Menschen^{32, 33, 39, 42, 71, 72, 73, 82, 83, 96} und mit 5 - 10 mg/kgKG etwas höher bei kleinen Versuchstieren, wie Hamster, Ratten und Mäusen. Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen HpD-Dosis konnten nicht gefunden werden.

Zeitintervall HpD-Gabe - Rotlichtbestrahlung:

Nach Gabe von HpD muß eine gewisse Zeit abgewartet werden, bevor mit der Lichtbehandlung begonnen werden kann, da HpD im tumorösen Gewebe

möglichst stark angereichert, im gesunden Gewebe dagegen bereits weitgehend geklärt sein soll (siehe Kap. 2.1.2). Das Zeitintervall wird in der Literatur für die Therapie am Menschen mit 48 h^{5, 42, 72, 73, 82, 83} oder aber länger mit 3 - 5 Tagen angegeben^{39, 42, 86}. Kleinere Versuchstiere werden zumeist nach einem kürzeren Zeitintervall bestrahlt.

Wegen der vermehrten Stoffwechselaktivität bei einem kleinem Versuchstier, wie der Maus, wurde die relativ hohe HpD-Dosis von 10 mg/kgKG und das relativ kurze Zeitintervall von 24 h für den Versuch ausgewählt. Tab. 7 stellt die Verteilung von HpD in verschiedenen Geweben in Abhängigkeit von der Zeit dar:

Zeit nach HpD-Gabe [h]	Blut	Tumor	Leber	Niere	Milz	Lunge	Haut	Muskel
3	21,38	3,31	32,86	12,67	11,88	9,82	3,20	0,98
24	2,76	3,40	29,07	8,40	9,96	2,03	1,90	1,90
48	0,91	4,10	27,18	7,16	9,69	2,57	2,64	0,00
72	0,96	2,39	23,51	6,34	8,70	1,53	1,88	0,00

Tab. 7: Verteilung des radioaktiven [¹⁴C]HpD in verschiedenen Geweben in Abhängigkeit von der Zeit nach HpD-Gabe (Versuchstier: C3H-Maus; [¹⁴C]HpD-Dosis: 10 mg/kgKG; Tumor: spontanes Mammakarzinom der C3H-Maus; Werte in µg [¹⁴C]HpD/g Gewebe)⁶¹.

Die Tab. 7 bestätigt, daß 24 h nach HpD-Gabe die größte Konzentrationsdifferenz von HpD im Tumor zu HpD in der Haut anzunehmen ist. Insgesamt ist diese Differenz in diesem Beispiel aber klein. Entsprechende Werte über Hautkarzinome liegen in der Literatur nicht vor.

Lichtdosis:

Die in der Literatur angegebenen Lichtdosen schwanken zwischen 8 J/cm² 146, 147, 148 und 1620 J/cm² 42. Häufiger verwendete Lichtdosen liegen bei 50 - 200 J/cm² 32, 38, 41, 86, 139. Da die Untersuchungen an Zell-

suspensionen, unterschiedlichen Tumormodellen sowie an verschiedenen menschlichen Tumoren durchgeführt wurden, konnten solche Angaben für diesen Versuch nicht übernommen werden.

In einem Vorversuch (Kap. 3.1) wurde die Dosis 120 J/cm^2 als die für den Versuch geeignetste Dosis ermittelt. Diese Dosis erschien als günstig, weil sie das Tumorstadium nicht nachhaltig behinderte, aber dennoch deutlich verzögerte. Dies war zu fordern, damit die Wirkung der Photochemotherapie mit HpD unter Verwendung variabler Leistungsdichten untersucht werden konnte.

4.2 Beurteilung der in der statistischen Auswertung verwendeten Daten

In den in Kap. 3.1 - 3.4 sowie in Kap. 3.6 dargestellten Untersuchungen handelt es sich um Versuche mit niedriger Fallzahl, die größtenteils für die Planung und Gestaltung des Hauptversuchs benötigt wurden. Für diese Versuche wurden keine statistischen Tests durchgeführt. Die Meßwerte des Hauptversuches (Kap. 3.5) wurden statistisch ausgewertet; sie wurden daher zuvor auf ihre statistische Verwendbarkeit untersucht.

Die Untersuchung der Verteilung der Meßwerte (siehe Kap. 3.5.1) ergibt, daß nur an 28 % aller Meßtage die Meßwerte annähernd normalverteilt sind. Vergleicht man Abb. 11 und Abb. 12, in denen ein Histogramm mit annähernd normalverteilten Meßwerten und eines mit nicht normalverteilten Meßwerten dargestellt ist, so erkennt man, daß bei der kleinen Fallzahl ($n = 7$) schon geringfügige Asymmetrien der Verteilung der Meßwerte um ihren Mittelwert eine nicht-Normalverteilung bewirken. Das Ergebnis von nur 28 % Meßtagen mit normalverteilten Meßwerten ist somit vor allem ein Problem der kleinen Fallzahlen und nicht unbedingt abnorm großen Abweichungen der Werte zuzuschreiben.

Dieses Problem wurde schon zu Beginn des Versuches erkannt. Da die Versuchstiere aber nur nach strengen Auswahlkriterien für den Versuch zugelassen werden sollten (siehe Kap. 2.7) und die Laserapparatur nur begrenzte Zeit zur Verfügung stand, war der Versuch mit größerer Tierzahl nicht realisierbar.

Die nicht normalverteilten Meßwerte ergeben größtenteils Histogramme, die etwa dem in Abb. 12 vergleichbar sind (siehe Skewnesswerte in den Tabellen des Anhanges). Die Kurve der Verteilung ist in diesem Histogramm nur leicht asymmetrisch.

Trotzdem werden für die uneingeschränkte Gültigkeit der durchgeführten statistischen Tests annähernd normalverteilte Meßwerte gefordert. Das Ergebnis der Untersuchung der Verteilung der Meßwerte sollte bei der Beurteilung der Statistiken daher bedacht werden.

In der Regressionsanalyse (siehe Kap. 3.5.2) wurde die Güte der Meßkurven innerhalb der Behandlungsgruppen berechnet. Da hier die Meßwerte von jeweils 7 Tieren über den Zeitraum von mehr als 3 Wochen eingehen, ist das Problem der kleinen Fallzahl bei diesem Test nicht relevant; dies schlägt sich positiv in den Ergebnissen nieder. Die Aussage der 0-Hypothese, die Wachstumskurven einer Gruppe seien zufällig verteilt, wird für alle Gruppen mit dem Signifikanzwert 0,0000 (= hoch signifikant) abgelehnt. Die Güte der Wachstumskurven innerhalb der Gruppen ist also sehr groß, was eine wichtige Voraussetzung für die statistische Verarbeitung der Daten darstellt.

Vergleicht man die Güte der Wachstumskurven der Gruppen untereinander (vgl. Korrelationskoeffizienten), so findet man die größte Güte der Kurven in den Kontrollgruppen (Grp. 11, 12, 13), die kleinste in der Gruppe mit der stärksten Wachstumsverzögerung (Grp. 15). Die anderen Gruppen liegen dazwischen. Das bedeutet, daß mit wirksamerer Behandlung die Güte der Wachstumskurven innerhalb der Gruppen abnimmt. Die Ursache hierfür könnte sein, daß bei der Behandlung die individuellen morphologischen Gegebenheiten der Tumoren (Gefäßversorgung, Nekrosen usw.) diese mehr oder weniger anfällig für die Behandlung machen, was zu einer größeren Streuung der Meßwerte führt.

Beurteilt man die Verwertbarkeit der Daten insgesamt, so findet man, daß durchaus aussagekräftige Werte vorliegen. Zu diesem Schluß kommt man, wenn man bedenkt, daß die Forderung nach annähernd normalverteilten Meßwerten in biologischen Versuchen nur selten erfüllt werden kann und daß die Regressionsanalyse optimale Ergebnisse liefert.

4.3 Die Bedeutung der Leistungsdichte in der Photochemotherapie mit HpD

Gleiche Versuchsbedingungen für die Untersuchungen mit variablen Leistungsdichten wurden geschaffen, indem die Wellenlänge des Lichtes (630 nm), die Lichtdosis (120 J/cm^2) konstant gehalten und die Tumoren während der Behandlung gekühlt wurden. Bedingt durch die Beziehung der Bestrahlungsparameter zueinander (Kap. 2.9.5, Formel 2) wurde die Bestrahlungszeit zur zweiten Variablen, da bei Erniedrigung der Leistungsdichte die Dosis nur durch Verlängerung der Bestrahlungszeit konstant zu halten war.

Die im Hauptversuch (siehe Kap. 3.5) durchgeführten Behandlungen mit 250 , 75 , und 25 mW/cm^2 führen alle zu deutlichen Wachstumsverzögerungen der Tumoren mit hochsignifikanter Abweichung von der Kontrollgruppe ohne jede Behandlung sowie den Kontrollgruppen mit Rotlichtbestrahlung ohne Photosensibilisierung.

Das Wachstum der Kontrollgruppen weicht dabei nicht signifikant voneinander ab.

Bei etwa gleichviel Freiheitsgraden der untersuchten Wachstumskurven läßt sich bei gleichem Signifikanzniveau eine weitere Abstufung der Wirksamkeit der Behandlungen durch die Betrachtung der Höhe der F-Statistikwerte vornehmen (Tab. 6).

Dabei zeigt sich, daß in dieser Untersuchung die Leistungsdichte von 75 mW/cm^2 die wirksamste Behandlung darstellt. Ihr folgt die Behandlung mit 25 mW/cm^2 , dann die mit 250 mW/cm^2 .

Im statistischen Vergleich des Tumorwachstums dieser behandelten Gruppen berechnet man eine hoch signifikante Abweichung der mit 75 mW/cm^2 (Grp. 15) zu der mit 250 mW/cm^2 behandelten Gruppe (Grp. 14), jedoch nur eine signifikante Abweichung der mit 25 mW/cm^2 (Grp. 16) zu der mit 250 mW/cm^2 behandelten Gruppe. Die Abweichung des Tumorwachstums zwischen Gruppe 15 und 16 ist dagegen nicht signifikant.

Der aus diesen Ergebnissen ablesbare Sachverhalt, daß zuerst durch Verringerung der Leistungsdichte (Photonendichte) die wachstumshemmende Wirkung der Behandlung verbessert wird, bei weiterer Ver-

ringerung der Leistungsdichte jedoch wieder abnimmt, erscheint zunächst unverständlich. Erst durch die Betrachtung der zweiten Variablen - der Bestrahlungszeit - läßt sich ein Zusammenhang vermuten, der im folgenden diskutiert werden soll.

Die Bestrahlungszeit wird - will man die Dosis konstant halten - bei der Erniedrigung der Leistungsdichte länger. Bei 250 mW/cm^2 wurde 8 min, bei 75 mW/cm^2 wurde 27 min und bei 25 mW/cm^2 wurde 80 min lang bestrahlt.

Ein anderer Aspekt scheint in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Die Photochemotherapie mit HpD soll v. a. in Zellfunktionen störend eingreifen, z. B.

- durch strukturelle Veränderungen von Zellmembranproteinen (Cross-linking^{24, 47, 48, 56, 57, 58}) und Membranproteinen von Zellorganellen (Liposomen, Mitochondrien) und daraus resultierender Aufhebung ihrer Funktion (Na^+/K^+ -Transport und Glukosetransport^{49, 60, 130});
- durch Oxidation von von Aminosäure- und Fettsäureresten^{10, 130};
- durch Aufhebung der normalen Barriereigenschaften von Membranen für verschiedene Stoffe^{24, 88};
- durch Störung der DNS-Synthese^{22, 23, 62, 107, 108, 111, 112, 130};
- durch O_2 -Mangel infolge einer Störung der Blutversorgung (Mikrothromben)^{24, 27}.

Berücksichtigt man den schädigenden Einfluß der Photochemotherapie mit HpD auf die Funktionen der Zellen, so scheint als Erklärung für die Abhängigkeit der Wachstums hemmung der Tumoren von der Bestrahlungszeit und der Leistungsdichte folgender Zusammenhang wahrscheinlich:

Jede Schädigung einer Zelle über die Behinderung ihrer Funktionen benötigt Zeit, da die Funktionen selbst zeitabhängig wirken.

Eine kurzfristige Schädigung wird bei gleicher Dosis daher leichter kompensiert als eine länger andauernde. Strukturelle Änderungen der Zelle können im Anschluß an die zellschädigende Einwirkung in begrenztem Umfang durch "Repair-Mechanismen" wieder rückgängig gemacht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden unter nachfolgender Hypothese interpretiert:

Durch Verringerung der Leistungsdichte bleibt - so kann man vermuten - bei konstanter Dosis die schädigende Wirkung auf die Zelle etwa gleich groß, weil die Anzahl eingestrahelter Photonen sich nicht ändert. Da sich aber die Bestrahlungszeit entsprechend verlängert, werden auch die Repair-Mechanismen länger in ihrer Funktion behindert, sodaß die effektive Schädigung der Zellen größer wird.

Bei weiterer Verminderung der Leistungsdichte wird der schädigende Einfluß pro Zeiteinheit so gering, daß schon unter der Behandlung Repair-Mechanismen kompensierend einsetzen können, was eine Abnahme der schädigenden Wirkung der Behandlung auf die Zelle trotz der längeren Bestrahlung zur Folge hat.

Diese Arbeitshypothese bedarf noch der Bestätigung. Vorerst soll aus den Ergebnissen dieser Untersuchung nur abgeleitet werden, daß es für eine effektive Therapie mit Hämatoporphyrin-Derivat und Licht nicht gleichgültig ist, in welcher Zeit eine bestimmte Lichtdosis appliziert wird. Die Bestrahlungszeit muß ausreichend lang bemessen sein, um eine irreversible Schädigung der Tumorzellen zu bewirken, die Leistungsdichte darf dabei einen noch genauer zu bestimmenden Minimalwert nicht unterschreiten, um während der Behandlung Repair Mechanismen auszuschalten.

Diese Ergebnisse des Versuches mit variabler Leistungsdichte sind für die Anwendbarkeit der Photochemotherapie mit HpD und Licht von großer Bedeutung. Wie in Kap. 4.4 noch diskutiert wird, sind ein nicht unerheblicher Anteil der Nebenwirkungen der Therapie an die Höhe der verwendeten Leistungsdichte gebunden. Andererseits konnte gezeigt werden, daß nicht unbedingt sehr hohe Leistungsdichten für eine effektive Behandlung nötig sind, wenn Bestrahlungszeit und Lichtdosis genügend groß gewählt werden.

Da bei der Behandlung von Tumoren der Haut auch längere Bestrahlungszeiten praktisch durchführbar wären (im Gegensatz z. B. zur Photochemotherapie mit HpD von Bronchialkarzinomen), wäre in der Dermatologie damit ein wichtiger Schritt zur Verringerung von Nebenwirkungen bei sogar verbesserter Effektivität der Behandlung möglich.

4.4 Die Bedeutung des Temperaturanstiegs im Tumor unter Behandlung

Zu Beginn der Versuche entstanden bei einem Teil der behandelten Tumoren tiefe Ulzerationen und großflächige Nekrosen (siehe Kap. 3.3 und Abb. 18). Da diese Gewebsdefekte sowohl bei Tieren, die mit HpD und Licht behandelt worden waren, als auch bei ihren nur mit Licht behandelten Kontrollgruppen vorkamen, konnte dieser Effekt nicht HpD-abhängig sein. Weitere Untersuchungen ergaben eine der Höhe der Leistungsdichte direkt proportionale Hemmung des Tumorwachstums mit Ausbildung von Oberflächendefekten ab 250 mW/cm^2 (siehe Abb. 17).

Temperaturmessungen (Kap. 3.4) in Tumoren unter Behandlung bestätigen die Vermutung, daß, abhängig von der Höhe der verwendeten Leistungsdichte, ein Temperaturanstieg im Tumor resultiert.

Schon bei der Leistungsdichte 75 mW/cm^2 beträgt der Temperaturanstieg etwa 3°C . Bei der Behandlung mit 500 mW/cm^2 steigt die Temperatur sogar um $19,6^\circ\text{C}$ auf $55,6^\circ\text{C}$ im Zentrum des Tumors an. Es besteht dabei kein wesentlicher Unterschied bei den Maximaltemperaturwerten in Tumoren nach und ohne vorherige HpD-Gabe.

Obwohl man annehmen muß, daß im Zentrum eines ca. 7 mm dicken Tumors nur noch ein Teil der an der Oberfläche eingestrahlten Leistungsdichte wirksam werden kann, ergeben die Messungen direkt unter gesunder Haut etwa gleich große Maximaltemperaturwerte wie im Zentrum der Tumoren (siehe Tab. 2). In einem anderen Versuch, in dem die Sonde aus dem Zentrum in den Randbereich des Tumors zurückgezogen wurde (Abb. 23), zeigt sich ein Temperaturgefälle vom Zentrum zur Oberfläche des Karzinoms.

Beide zuletzt beschriebenen Ergebnisse weisen auf einen Wärmestau im Zentrum des Tumors hin, der auch in anderen Bereichen der Krebsforschung schon beobachtet wurde^{13, 120, 127}. Während die gute Vaskularisation der Haut einen schnellen Wärmeabtransport ermöglicht, so sind die Tumoren - so kann man vermuten - auf Grund unzureichender Gefäßversorgung nicht in der Lage, die Wärme völlig abzugeben.

Durch Hyperthermieversuche konnte man in den letzten Jahren beweisen, daß die Zellen einer Vielzahl von Malignomen, verglichen mit gesundem Gewebe, sehr sensibel gegen Erwärmung sind⁷. Es gelang dabei, Tumoren durch Erhitzung auf 41 - 43 °C selektiv zu schädigen^{7, 114}. Man versuchte daher, Tumoren durch Hyperthermie zu behandeln^{113, 114} oder die Effektivität bekannter Tumorbehandlungen durch adjuvante Erwärmung der Tumoren zu steigern^{13, 54, 55, 75, 120}. Der letztere Versuch war auch bei der Röntgenbestrahlung spinözellulärer Karzinome erfolgreich.

Der Hyperthermieeffekt bei der Photochemotherapie mit HpD konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden - bei Leistungsdichten, die allgemein Verwendung finden (75 - 500 mW/cm²).

Die Temperatur, bei der eine selektive Schädigung der Tumorzellen beschrieben ist (41 - 43 °C), wird schon bei einer Leistungsdichte von 125 mW/cm² erreicht. Dies kann nicht ausschließen, daß auch bei geringerer Leistungsdichte ein Teil der Wirkung der Photochemotherapie mit HpD auf einen Thermoeffekt zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen sind hier noch erforderlich. Bei Leistungsdichten in der Höhe von 500 mW/cm² übertrifft der Thermoeffekt ($T_{\max} = 55,6$ °C) die HpD-spezifische phototoxische Reaktion bei weitem, da im Bereich von 55 - 65 °C Proteine zu koagulieren beginnen. Eine selektive Zerstörung von tumorösem Gewebe ist bei solch hohen Leistungsdichten daher nicht mehr möglich.

Bei den Untersuchungen mit variablen Leistungsdichten (Kap. 3.5) wurden die Tumoren gekühlt, um die HpD-spezifische phototoxische Schädigung der Tumoren selektiv darzustellen. Dies gelang weitgehend. Temperaturmessungen in gekühlten Tumoren ergaben nur geringfügige Erhöhungen der Werte über Körpertemperatur. Die Wachstumskurven der Kontrollgruppen mit alleiniger Lichtbehandlung, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, zeigen dennoch einen geringen Thermoeffekt. Zwischen Grp. 11 und Grp. 12 wird ein Growth Delay von $GD_{300} = 2,7$ Tagen berechnet (siehe Abb. 28).

Wie beschrieben wurden in dieser Arbeit die Tumoren gekühlt, um selektiv die phototoxische Reaktion der Behandlung zu untersuchen. Das

bedeutet nicht, daß es generell sinnvoll ist, den Hyperthermieeffekt bei der Photochemotherapie mit HpD zu verhindern. Vielmehr wird man sich diesen Effekt bei der Therapie nutzbar machen und dies bei der Wahl der Leistungsdichte zu einer Behandlung berücksichtigen. Die verzögerte Wärmeabgabe der Tumoren begünstigt dabei eine Ausnutzung des Hyperthermieeffektes. Die Grenzen dieser Ausnutzung werden durch unerwünschte Nebenwirkungen gesetzt, da der Hyperthermieeffekt zwar die Wirkung der Behandlung verbessert, dies aber auf Kosten der Tumorselektivität geht.

Abschließend soll noch bemerkt werden, daß in der gesamten bearbeiteten Literatur der Hyperthermieeffekt in der Photochemotherapie mit HpD nur von zwei Autorengruppen diskutiert wird^{7, 131, 132, 141}.

Da auch die Kühlung behandelter Tumoren nicht beschrieben wird, kann man schließen, daß in den Ergebnissen der Veröffentlichungen zumeist der phototoxische- und der Hyperthermieeffekt gemeinsam dargestellt ist. Wenn größere Leistungsdichten als ca. 50 mW/cm^2 verwendet wurden, kann dies zu Fehlinterpretationen führen.

4.5 Nebenwirkungen der Photochemotherapie mit HpD

Die Beziehung zwischen Ulzerationen der Tumoren und der Höhe der Leistungsdichte bzw. des Temperaturanstiegs im Tumor ist schon in Kap. 4.4 angesprochen worden. Während aller Versuche mit gekühlten Tumoren wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen der Behandlung mehr beobachtet.

Direkt nach der Lichtbehandlung begann sich im bestrahlten Bereich der Haut lediglich ein etwas teigiges Ödem zu entwickeln, welches seine größten Ausmaße am 2. - 3. Tag erreichte und am 5. Tag nach der Behandlung wieder verschwunden war (siehe Abb. 24/a). Auffallend war, daß die Haut nach der Behandlung blasser als die nicht bestrahlte umgebende Haut wirkte, was im Zusammenhang mit den in den Histologien beschriebenen, thrombosierten Gefäßen auf ein Angreifen der Therapie an der O_2 -Versorgung der Tumoren hinweist^{24,27}. Leichte Rötungen der Haut traten selten und meistens erst am 2. - 3. Tag nach der Behandlung auf.

In einem Versuch wurden Hautreaktionen durch Steigerung der Lichtdosis provoziert (siehe Kap. 3.6). Die Leistungsdichte betrug dabei 250 mW/cm^2 .

Bei 50 J/cm^2 zeigen sich keinerlei Veränderungen im histologischen Bild der Haut.

Die Dosis von 100 J/cm^2 bewirkt eine leichte phototoxische Reaktion der Haut, die im histologischen Bild nicht prinzipiell von anderen toxischen Hautreaktionen abweicht.

Mit Dosen von 300 und 500 J/cm^2 lassen sich schon hautdestruierende Effekte hervorrufen, die sich histologisch als koagulierte und demarkierte Areale darstellen.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die Lichtdosen etwa 200 J/cm^2 nicht überschreiten dürfen, wenn die Tumoren von intakter Haut überdeckt bleiben sollen. Diese Angabe kann jedoch nur für die Haut der Maus und bei Kühlung unter der Behandlung gelten.

Die fraktionierte Bestrahlung könnte eine Möglichkeit zur weiteren

Dosissteigerung bei Vermeidung von lokalen Nebenwirkungen am gesunden Gewebe sein. Sie wurde schon bei einigen menschlichen tumorösen Erkrankungen praktiziert^{38, 39, 72, 73}.

In der Literatur beschriebene Beobachtungen über Nebenwirkungen der Photochemotherapie am Menschen beziehen sich fast ausschließlich auf eine meist leichte und schnell vorübergehende phototoxische Reaktion der Haut (Erythem). Diese tritt bei Patienten auf, die den ärztlichen Rat nicht befolgen, einige Zeit nach HpD-Gabe Sonnenlicht und starkes Kunstlicht zu meiden^{47, 82, 86, 115, 147}.

Schmerzen während der Behandlung wurden nur von einigen Patienten angegeben, bei denen stark ulzerierende Hautmalignome therapiert wurden. Andere unerwünschte Nebenwirkungen wurden bisher nicht beobachtet. Insbesondere wurden nach HpD-Gabe keine anderen toxischen Auswirkungen der Substanz als die an der Haut festgestellt.

Abschließend kann das Problem der unerwünschten Nebenwirkungen heute jedoch noch nicht beurteilt werden. Weitere Untersuchungen stehen noch aus. Da u. a. DNA-Moleküle durch die Photochemotherapie mit HpD geschädigt werden, wird auch ein karzinogener Effekt nicht ausgeschlossen^{10, 66, 86}; dieser ist aber bisher noch nicht beschrieben worden.

4.6 Perspektiven der Photochemotherapie mit HpD

Die Photochemotherapie mit HpD wurde bisher schon an einer Vielzahl menschlicher Tumoren untersucht. Die im folgenden aufgeführten Therapie - und Diagnoseversuche zeigen eine Auswahl der eventuell in Zukunft möglichen Anwendungsbereiche:

- Therapie von Blasenkarzinomen mit HpD und Licht (Kelly^{84,85} 1976: 200 W Quecksilberdampflampe; Zytoskop).
- Diagnose von in situ-Karzinomen des Bronchialsystems mit HpD und UV-Licht (Cortese²⁶ 1979: 200 W Quecksilberdampflampe; Fiberbronchoskop).
- Therapie von Gliomen mit HpD und Licht nach Spickung der Tumoren mit dünnen Glasfaserlichtleitern (Chon²¹ 1981: Dye-Laser).

- Therapie von Tracheal- und Bronchialkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium mit HpD und Licht (Cortese²⁷ 1982: Dye-Laser; Fiber-bronchoscop).
- Therapie von Intraokulären Tumoren (Melanom) mit HpD und Licht (Bruce¹⁴ 1984: Dye-Laser).

Auch im dermatologischen Bereich wurden in den letzten Jahren eine Reihe tumoröser Erkrankungen mit Hilfe der Photochemotherapie mit HpD versuchsweise behandelt:

- Hautmetastasen von Mammakarzinomen; spinozelluläre Karzinome; Basaliome; maligne Melanome; Karposi-Sarkome und Mycosis fungoides (Helium-Neon-Laser; Dye-Laser; Rotlicht einer Xenon-Lampe^{38, 41, 146}).

Bei den ca. 3000 bis heute durchgeführten Behandlungen liegt der Schwerpunkt in der Therapie von Tumoren des Bronchialsystems. Da es sich meist um Behandlungen von Einzelfällen handelt, ist die mögliche Weiterentwicklung der Therapie zur Zeit nur schwer abzuschätzen. Trotzdem scheint ein vorsichtiger Optimismus erlaubt; bei allen bisher behandelten Tumoren wurde, wenn auch in einem unterschiedlichen Ausmaß, ein Ansprechen auf die Behandlung beschrieben.

Bemerkenswert ist, daß die Anreicherung von HpD in tumorösem Gewebe weitgehend unabhängig von der Art des Tumors zu sein scheint^{16, 38}. Völlig therapieresistente Tumoren wurden noch nicht beobachtet. Wichtige Voraussetzung für eine effektive Therapie ist aber eine ausreichende Lichtzufuhr. Daher werden sehr dicke oder aber stark pigmentierte Tumoren auch mit einer verbesserten Photochemotherapie mit HpD in Zukunft nicht behandelbar sein⁴¹.

Gerade die Lichtzufuhr bietet in der Dermatologie keine großen Probleme. Es sollte in diesem Bereich deshalb leichter sein, die Therapie mit HpD und Licht bis zur klinischen Anwendbarkeit weiter zu entwickeln. Für welche Erkrankungen die Therapie in Frage kommen

könnte, ist noch zu prüfen. Dies hängt nicht nur von der neuen Therapie selbst, sondern auch von den vorhandenen Behandlungsalternativen ab.

Denkbar wäre die Photochemotherapie mit HpD in Bereichen, in denen konventionelle Methoden versagen oder aus gewissen Gründen nicht anwendbar sind. Dies findet man häufig bei multilokulären Metastasen bestimmter Tumoren - Hautmetastasen von Mammakarzinomen und Melanomen können als Beispiel angeführt werden.

Auch andere multilokuläre Tumoren könnten für die Photochemotherapie mit HpD in Betracht kommen, bei denen wirkungsvolle Behandlungen mit akzeptabler Nebenwirkung nicht bekannt sind. Dies wären u. a. bestimmte Lymphome der Haut, wie die Mycosis fungoides, das Basalzellnävussyndrom oder multiple Basaliome.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, daß zur effektiven Therapie mit HpD und Licht keine hohen Leistungsdichten nötig sind, sondern vielmehr die Bestrahlungszeit eine wichtige Rolle spielt, sind auch großflächige Rotlichtbestrahlungen denkbar. Dabei könnten auch kleinere okkulte Herde mitbestrahlt werden. Die HpD-Fluoreszenz könnte das Auffinden solcher Herde erleichtern.

Wenn mit niedrigen Leistungsdichten effektiv und mit weniger lokalen Nebenwirkungen behandelt werden kann, wird die Frage zu prüfen sein, ob aufwendige Laserapparaturen für die Behandlung notwendig sind. Die Verwendung von einfacheren, billigeren Lichtquellen würde die breitere Anwendung der Photochemotherapie mit HpD ermöglichen.

Insgesamt enthält die Photochemotherapie mit HpD für die Behandlung tumoröser Erkrankungen im dermatologischen Bereich interessante Aspekte. Auch die Dermatologie wird deshalb die Erforschung dieser Therapie aktiv mittragen und für ihre spezifischen Anforderungen weiterentwickeln.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) ist eine photosensibilisierende, tumorselektive Substanz. Nach parenteraler Gabe reichert sich HpD in einer Vielzahl von Tumoren an. Durch nachfolgende Bestrahlung mit tief penetrierendem Rotlicht werden die Tumoren durch die Auslösung einer starken phototoxischen Reaktion zerstört.

Die Photochemotherapie mit HpD und Licht wurde bereits in einigen Fällen am Menschen angewandt. Systematische Untersuchungen der Behandlung bei unterschiedlichen Leistungsdichten des Lichtes fehlten jedoch bislang. Diese Arbeit sollte den Einfluß verschiedener Leistungsdichten auf die Wirksamkeit der Therapie klären.

In einer prospektiven Studie wurde an einem Tumormodell (Hautkarzinom der Maus) bei konstanter Lichtdosis (120 J/cm^2) und Wellenlänge (630 nm) die Wirkung unterschiedlicher Leistungsdichten (mW/cm^2) in der Photochemotherapie mit HpD untersucht. 24 h nach HpD-Gabe (10 mg/kgKG i.p.) wurden Tiergruppen ($n = 7$) wie folgt behandelt:

Kontrollgruppen (keine Photosensibilisierung):

Grp.11; Gruppe ohne jede Behandlung

Grp.12; Rotlicht 250 mW/cm^2 ; Bestrahlungszeit 8 min; kein HpD

Grp.13; Rotlicht 75 mW/cm^2 ; Bestrahlungszeit 27 min; kein HpD

Behandlungsgruppen (Photosensibilisierung):

Grp.14; Rotlicht 250 mW/cm^2 ; Bestrahlungszeit 8 min; HpD-Gabe

Grp.15; Rotlicht 75 mW/cm^2 ; Bestrahlungszeit 27 min; HpD-Gabe

Grp.16; Rotlicht 25 mW/cm^2 ; Bestrahlungszeit 80 min; HpD-Gabe

Die Tumoren wurden unter Behandlung durch Betropfen mit NaCl-Lösung gekühlt.

Ergebnisse:

Die Wachstumskurven der drei Kontrollgruppen zeigten keine signifikanten Abweichungen voneinander.

Die drei mit den Leistungsdichten 250, 75 und 25 mW/cm^2 bestrahlten Behandlungsgruppen zeigten hoch signifikante Wachstumsverzögerungen zu jeder ihrer Kontrollgruppen.

Die mit 75 mW/cm^2 behandelte Gruppe wies die größte Wachstumsverzögerung mit dem Growth Delay von 10,7 Tagen bei 300 mg Tumormasse auf,

gefolgt von der mit 25 mW/cm^2 behandelten Gruppe mit einem $\text{GD}_{300} = 9,7$ Tage. Die mit 250 mW/cm^2 behandelte Gruppe zeigte die geringste Wachstumsverzögerung mit dem $\text{GD}_{300} = 5,8$ Tage.

Bei ungekulten Tumoren traten bei hohen Leistungsdichten ($250 - 500 \text{ mW/cm}^2$) - auch ohne HpD-Gabe - tumordestruierende Effekte auf.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Größe der Leistungsdichte einen wesentlichen Einfluß auf die Wirksamkeit der Therapie hat.

Es zeigte sich jedoch, daß selbst hohe Leistungsdichten bei kurzer Bestrahlungszeit nicht den gleichen tumordestruierenden Effekt aufwiesen wie geringere Leistungsdichten bei längerer Bestrahlungszeit.

Sehr lange Bestrahlungszeiten brachten dagegen keine Verbesserung der Wirksamkeit der Therapie. Da außerdem gezeigt werden konnte, daß bei Erhöhung der Leistungsdichte die Nebenwirkungen an der Haut verstärkt auftreten, wird deutlich, daß für eine Behandlung am Menschen das optimale Verhältnis von Leistungsdichte und Bestrahlungszeit bestimmt werden muß. Es läßt sich dadurch eine Verbesserung der Wirksamkeit der Photochemotherapie mit HpD bei Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen erreichen.

6 ANHANG

6.1 Techniken zur Autoradiographie (zu Kap. 2.3.2)

Für die autoradiographische Untersuchung der Proliferationskinetik des Tumors wurde das in vitro-Verfahren gewählt, welches dem in vivo-Verfahren vergleichbare Ergebnisse liefert¹⁴³.

Aufbereitung des Tumors:

Sechs Tiere mit unterschiedlich großen Tumoren wurden getötet, die Tumoren herauspräpariert und gewogen. Mit einem Schneidegerät aus 3 Rasierklingen, die exakt im Abstand von 0,37 mm miteinander verschraubt waren, wurden mehrere Scheibchen aus dem Tumor geschnitten. Es wurde darauf geachtet, das Gewebe möglichst wenig zu traumatisieren.

Inkubation des Tumorgewebes mit dem radioaktiven Nukleosid ^3H -Thymidin (^3H -TdR):

Die 370 μm dicken Tumorscheibchen wurden in einer Petrischale mit Eagles-Lösung vorsichtig entfaltet. Die Lösung enthielt einen Zusatz von 2 μCi / ml ^3H -Thymidin (spez. Aktivität 2 - 5 Ci / mmol). Die Petrischale wurde dann in eine Plexiglasdruckkammer gebracht und einem Druck von 2,5 atü Sauerstoff ausgesetzt. In einem Schüttelwasserbad erreichte das Inkubationsmedium nach ca. 30 min eine Temperatur von 37 °C. Es wurde dort für 2 Stunden belassen. Nach der Inkubation wurde der Überdruck abgelassen und das radioaktive Medium mit einer Spritze abgesaugt. Danach wurden die Tumorscheibchen mit Hank's-Lösung, die einen Zusatz von unmarkiertem Thymidin enthielt, 5 min gespült. Nicht inkorporiertes ^3H -Thymidin wurde so entfernt.

Fixierung des Präparates:

In einem Gemisch aus Formalin und Alkohol wurden die Scheibchen ausgebreitet und unter Belastung eines siebartigen Bleches 60 min anfixiert. Mit Hilfe einer Biopsiekapsel des Einbettungsautomaten Autotechnikon (Fa. Technikon) wurden die Tumorscheibchen dann ent-

gültig fixiert. Danach wurde das Präparat in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich in Methylmethacrylat eingebettet. Die so erzeugten Acrylatblöcke konnten in einem Hartschnittmikrotom K (Fa. Jung AG) zu ca. 20 Schnitten von 3 µm Dicke geschnitten werden. Die Schnitte wurden dann in einem Wasserbad von 45 °C gestreckt und auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen. In einem Trockenschrank wurden sie gepreßt und bei 40 °C getrocknet.

Beschichten mit Fotoemulsion und Färbung:

Mit Methylglykolacetat wurden die zur Autoradiographie ausgewählten Schnitte sorgfältig von Methylacrylat befreit und anschließend mit 99 % Äthanol gespült und luftgetrocknet. In der Dunkelkammer wurden die Schnitte dann mit NTB 2 Fotoemulsion, die bei 42 °C geschmolzen und mit aqua bidest. 1 : 1 verdünnt wurde, durch kurzes Eintauchen beschichtet (dipping Methode). Die so behandelten Präparate mußten dann in einem lichtundurchlässigen Behälter für 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Luftfeuchtigkeit wurde durch Silikagel niedriggehalten.

Mit Kodak Entwickler D 19 b und Kodak Unifix wurden die Schnitte nach dieser Expositionszeit entwickelt und fixiert. Nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Abdeckung mit Eukitt waren die Präparate dann fertig zur Auswertung.

Auswertung der Autoradiographien:

Die Auswertung der Autoradiographien wurde mit einem Zeiss Stereo-Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung vorgenommen. Dabei war das Okular mit einem Strich versehen, der sich auf das Präparat abbildete. Markierte Zellen waren erkennbar an einer deutlichen Ansammlung von schwarzen Silberkörnern im Bereich der Zellkerne. Alle markierten und nicht markierten Zellen, die der Strich schnitt, wurden getrennt gezählt, indem man in einer meanderförmigen Linie das gesamte Präparat absuchte. Gefäßendothelien und Leukozyten wurden nicht berücksichtigt.

Das Problem der Auswertung der Autoradiographien liegt darin, daß jedes Präparat eine Hintergrundmarkierung aufweist. So ist dem Untersucher eine gewisse Subjektivität belassen, welche Zelle er

als markiert gelten läßt. Vergleiche mit Untersuchungen anderer Personen sind daher nur bedingt zulässig.

In diesem Versuch wurden nur Kerne als markiert gezählt, deren Silberkorndichte deutlich höher war, als die der Hintergrundmarkierung. Eine Differenzierung unterschiedlicher Tumorpartien wurde nicht vorgenommen.

6.2 Techniken zur Tumorinduktion mittels einer Zellsuspension (zu Kap. 2.4.6)

Die Auswahl der Spendertiere erfolgte hier nach gleichen Kriterien wie zur Transplantation (siehe Kap. 2.4.1).

Die folgenden Mengenangaben der verwendeten Lösungen beziehen sich auf die Verarbeitung von 4 Spendertumoren mit einem Gesamtgewicht von 12,8 g. Die extirpierten und von losem Bindegewebe befreiten Tumoren wurden mit einer Schere zu einem Brei zerkleinert. Der Gewebepulver wurde in einen Erlenmeyerkolben eingebracht und 30 ml Trypsinlösung (Lösung 1) hinzugegeben, die die Tumorzellen aus ihrem Zellverband lösen sollte. In einem Wasserbad (37 °C) wurde das Gemisch 20 min gerührt und anschließend durch einen Mullappen gefiltert, um größere Gewebesteile zu entfernen. Dann wurde bei 1000 U/min zentrifugiert.

Es entstand ein nicht ganz homogenes Sediment (Zellen) und ein roter Überstand (Trypsinlösung). Das Sediment wurde mit etwa 8 ml Phosphatpuffer (Lösung 2) aufgeschwemmt und durch Aufsaugen und Ablassen mit einer Pipette gut durchgemischt. Dies ergab die Stammlösung der Zellsuspension.

Für die Zählung der Tumorzellen in der Stammlösung mußte diese verdünnt und die Zellen angefärbt werden. Um die Lösung 50-fach zu verdünnen, wurde einer Probe von 0,1 ml nochmals 4,9 ml Phosphatpuffer hinzugegeben. Eine 100-fache Verdünnung entstand, nachdem 0,5 ml der verdünnten Suspension 0,5 ml Eosinlösung (0,1 %) zugesetzt wurden. Die Eosinlösung färbte avitale Zellen (veränderte Membranstruktur) rötlich an, während die vitalen Zellen ungefärbt blieben.

In einer "Bürker Zählkammer" konnten daraufhin vitale und avitale

Zellen ausgezählt und deren Quotient errechnet werden. Bei kleinem Quotient ist die Zellsuspension zur Tumorinduktion ungeeignet, da sich dann zu viele avitale Zellen in ihr befinden. In diesem Fall kann man die im Mullappen abgefilterten Gewebsstücke nochmals trypsinieren (siehe oben) und die 2. Fraktion dann ebenfalls den folgenden Verdünnungsschritten unterziehen. Dadurch ist eine Erhöhung des Quotienten vitale Zellen / avitale Zellen zu erreichen. Die absolute Zahl vitaler Zellen nimmt aber mit jeder weiteren Fraktion ab.

Bei der 1. Fraktion dieses Beispiels wurden

27 vitale (ungefärbte) Zellen,	
335 avitale (gefärbte) Zellen,	
362 gesamte	Zellen

gezählt. Der Quotient vitale / avitale Zellen betrug 0,08. Das entspricht 7,5 % vitale Zellen. Um die Zahl der Zellen / ml zu errechnen, mußte man die gezählten Zellzahlen mit dem Umrechnungsfaktor der "Bürker Zählkammer" ($F = 1740$) multiplizieren:

$$27 \text{ vitale Zellen} \cdot 1740 = 46\,980 \text{ vitale Zellen / ml Lös.}$$

Um die Zellzahl der Stammlösung zu berechnen, mußte die 100-fache Verdünnung berücksichtigt werden:

$$46\,980 \text{ vitale Zellen} \cdot 100 \hat{=} 4,7 \text{ Millionen vitale Zellen / ml Stammlösung}$$

Wegen des niedrigen Anteils vitaler Zellen war jedoch diese 1. Fraktion zur Tumorinduktion ungeeignet.

Bei der 2. Fraktion wurden

19 vitale (ungefärbte) Zellen,	
29 avitale (gefärbte) Zellen,	
48 gesamte	Zellen

gezählt. Der Quotient vitale / avitale Zellen beträgt 0,7. Das entspricht 39,6 % vitale Zellen. Nach Multiplizieren mit dem Faktor F der Zählkammer und Berücksichtigung der Verdünnung berechnete man 3,3 Millionen vitale Zellen / ml Stammlösung. Diese 2. Fraktion war somit wesentlich besser zur Tumorinduktion geeignet als die 1. Fraktion.

Zur sicheren Tumorinduktion werden für die Injektion bei einem Tier etwa 100 000 vitale Tumorzellen benötigt. 1 ml der Stammlösung (3,3 Millionen vitale Zellen / ml) wurden daher nochmals 2,3 ml Phosphatpuffer zugesetzt. Dann enthalten 3,3 ml der Lösung 3,3 Millionen vitale Tumorzellen, 1 ml enthält somit 1 Million und 0,1 ml 100 000 Zellen. 0,1 ml ist also die Menge an Zellsuspension, die für die Tumorinduktion bei einem Versuchstier benötigt wird.

Lösung 1:

Solution A = 0,2 %ige Trypsinlösung

NaCl	8,33 g	] in 1 l Aqua bidest. lösen + 2 g Trypsin
KCl	0,40 g	
NaHCO ₃	0,35 g	
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,06 g	
KH ₂ PO ₄	0,06 g	
Phenolrot	0,02 g	

Lösung 2:

Phosphatpuffer PBS

NaCl	8,2 g	] in 1 l Aqua bidest. lösen + 100 mg Bykomycin
KCl	0,4 g	
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,73g	
KH ₂ PO ₄	0,3 g	

6.3 Ergebnistabellen statistischer Berechnungen

Für die Gruppen 11 - 16 wurden gesondert und für jeden Meßtag allgemeine statistische Berechnungen durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden tabellarisch dargestellt sind (vgl. Kap. 2.10.ff). Dabei bedeutet:

— VARIABLE GEWO - GEW23	statistische Berechnungen mit den Meßwerten (<u>Tumormasse in mg</u>) einer Gruppe vom 0. - 23. Tag nach der Behandlung
— MEAN	arithmetischer Mittelwert
— MINIMUM	kleinster Wert
— MAXIMUM	größter Wert
— SUM	Gesamtsumme der Werte
— RANGE	Streubreite der Werte
— VARIANCE	Varianz
— STD DEV	Standardabweichung
— S.E. MEAN	Standardfehler
— SKEWNESS	Abweichung von einer Normalverteilung
— VALID OBSERVATIONS	gültige Meßwerte
— MISSING OBSERVATIONS	fehlende Meßwerte

Die Angaben KURTOSIS, S.E. SKEW, S.E. KURT sind weiterführende Berechnungen zur Abweichung der Meßwerte von einer Normalverteilung. Auf diese Angaben wird in der Arbeit nicht weiter eingegangen.

Für die Gruppen 11 - 16 wurden ebenfalls die Wachstumszeiten bestimmt, da diese für die Darstellung des Growth Delays benötigt wurden. Auch für diese Wachstumszeiten wurden die oben beschriebenen statistischen Berechnungen durchgeführt. Die Gruppen 21 - 26 entsprechen dabei in den Tabellen den Gruppen 11 - 16. Die VARIABLE ist jedoch hier die Wachstumszeit in Tagen, berechnet für fixe Tumormassen, die den Vielfachungen der Tumormasse am Behandlungstag entsprechen. Dabei bedeutet die Angabe:

GEW1 $\hat{=}$ 90 mg

GEW2 $\hat{=}$ 120 mg

GEW3 $\hat{=}$ 150 mg

GEW4 $\hat{=}$ 180 mg

GEW5 $\hat{=}$ 240 mg

GEW6 $\hat{=}$ 300 mg

GEW7 $\hat{=}$ 360 mg

GEW8 $\hat{=}$ 420 mg

GEW9 $\hat{=}$ 480 mg

GEW10 $\hat{=}$ 540 mg

GEW11 $\hat{=}$ 600 mg

GEW12 $\hat{=}$ 660 mg

GEW13 $\hat{=}$ 720 mg

GEW14 $\hat{=}$ 780 mg

GEW15 $\hat{=}$ 840 mg

Die gemittelten Wachstumszeitwerte, d. h. die Wachstumszeit einer Gruppe, können z.B unter MEAN für eine bestimmte Gruppe und eine bestimmte Tumormasse abgelesen werden.

MAUSGRP: 11

VARIABLE GEW0		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	60.000	.000	.000
VARIANCE	.000	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	60.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW1		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	72.400	1.802	5.700
VARIANCE	32.489	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	.905	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	65.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW2		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	88.100	3.192	10.093
VARIANCE	101.878	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	.858	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	76.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW3		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	109.800	4.232	13.382
VARIANCE	179.067	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	1.096	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	92.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW4		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	133.200	5.299	16.758
VARIANCE	280.844	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	1.119	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	113.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW5		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	159.000	6.810	21.536
VARIANCE	463.778	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	1.033	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	135.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW6		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	186.800	8.447	26.712
VARIANCE	713.511	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	.863	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	156.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW7		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	215.500	10.281	32.511
VARIANCE	1056.944	KURTOSIS	S.E. KURT
SKEWNESS	.839	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	179.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0	

MAUSGRP: 11

VARIABLE	GEW8		
MEAN	246.600	S.E. MEAN 12.382	STD DEV 39.156
VARIANCE	1533.156	KURTOSIS -.460	S.E. KURT 1.942
SKEWNESS	.819	S.E. SKEW .687	RANGE 108.000
MINIMUM	203.000	MAXIMUM 311.000	SUM 2466.000
VALID OBSERVATIONS - 10 MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW9		
MEAN	269.500	S.E. MEAN 11.403	STD DEV 32.253
VARIANCE	1040.286	KURTOSIS -1.306	S.E. KURT 1.969
SKEWNESS	.352	S.E. SKEW .752	RANGE 86.000
MINIMUM	234.000	MAXIMUM 320.000	SUM 2156.300
VALID OBSERVATIONS - 8 MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE	GEW10		
MEAN	296.167	S.E. MEAN 15.019	STD DEV 36.788
VARIANCE	1353.367	KURTOSIS -2.006	S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	.670	S.E. SKEW .845	RANGE 80.000
MINIMUM	265.000	MAXIMUM 345.000	SUM 1777.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 4			

VARIABLE	GEW11		
MEAN	341.750	S.E. MEAN 21.922	STD DEV 43.843
VARIANCE	1922.250	KURTOSIS -3.545	S.E. KURT 2.582
SKEWNESS	.335	S.E. SKEW 1.014	RANGE 93.000
MINIMUM	300.000	MAXIMUM 393.000	SUM 1367.000
VALID OBSERVATIONS - 4 MISSING OBSERVATIONS - 6			

VARIABLE	GEW12		
MEAN	382.500	S.E. MEAN 57.500	STD DEV 81.317
VARIANCE	6612.500	KURTOSIS .	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW .	RANGE 115.000
MINIMUM	325.000	MAXIMUM 440.000	SUM 765.000
VALID OBSERVATIONS - 2 MISSING OBSERVATIONS - 8			

VARIABLE	GEW13		
MEAN	421.000	S.E. MEAN 66.000	STD DEV 93.338
VARIANCE	8712.000	KURTOSIS .	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW .	RANGE 132.000
MINIMUM	355.000	MAXIMUM 487.000	SUM 842.000
VALID OBSERVATIONS - 2 MISSING OBSERVATIONS - 8			

VARIABLE	GEW14		
MEAN	461.000	S.E. MEAN 76.000	STD DEV 107.480
VARIANCE	11552.000	KURTOSIS .	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW .	RANGE 152.000
MINIMUM	385.000	MAXIMUM 537.000	SUM 922.000
VALID OBSERVATIONS - 2 MISSING OBSERVATIONS - 8			

VARIABLE	GEW15		
MEAN	500.000	S.E. MEAN 85.000	STD DEV 120.208
VARIANCE	14450.000	KURTOSIS .	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW .	RANGE 170.000
MINIMUM	415.000	MAXIMUM 585.000	SUM 1000.000
VALID OBSERVATIONS - 2 MISSING OBSERVATIONS - 8			

MAUSGRP: 11

VARIABLE	GEW16		
MEAN	540.000	S.E. MEAN	95.000
VARIANCE	18050.000	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	445.000	MAXIMUM	635.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	134.350
		S.E. KURT	.
		RANGE	190.000
		SUM	1080.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW17		
MEAN	579.000	S.E. MEAN	104.000
VARIANCE	21632.000	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	475.000	MAXIMUM	683.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	147.078
		S.E. KURT	.
		RANGE	208.000
		SUM	1158.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW18		
MEAN	619.000	S.E. MEAN	114.000
VARIANCE	25992.000	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	505.000	MAXIMUM	733.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	161.220
		S.E. KURT	.
		RANGE	228.000
		SUM	1238.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW19		
MEAN	662.500	S.E. MEAN	122.500
VARIANCE	30012.500	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	540.000	MAXIMUM	785.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	173.241
		S.E. KURT	.
		RANGE	245.000
		SUM	1325.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW20		
MEAN	705.000	S.E. MEAN	130.000
VARIANCE	33800.000	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	575.000	MAXIMUM	835.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	183.848
		S.E. KURT	.
		RANGE	260.000
		SUM	1410.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW21		
MEAN	755.000	S.E. MEAN	140.000
VARIANCE	39200.000	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	615.000	MAXIMUM	895.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	197.990
		S.E. KURT	.
		RANGE	280.000
		SUM	1510.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW22		
MEAN	817.500	S.E. MEAN	152.500
VARIANCE	46512.500	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	665.000	MAXIMUM	970.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	215.668
		S.E. KURT	.
		RANGE	305.000
		SUM	1635.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

VARIABLE	GEW23		
MEAN	887.500	S.E. MEAN	162.500
VARIANCE	52812.500	KURTOSIS	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.
MINIMUM	725.000	MAXIMUM	1050.000
VALID OBSERVATIONS	- 2	STD DEV	229.810
		S.E. KURT	.
		RANGE	325.000
		SUM	1775.000
		MISSING OBSERVATIONS - 8	

MAUSGRP: 12

VARIABLE GEW0		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	60.000	.000	.000
VARIANCE	.000	KURTOSIS	.000
SKEWNESS	.000	S.E. SKEW	RANGE
MINIMUM	60.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW1		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	66.714	2.679	7.089
VARIANCE	50.238	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.693	S.E. SKEW	20.000
MINIMUM	55.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW2		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	76.286	4.684	12.392
VARIANCE	153.571	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.880	S.E. SKEW	35.000
MINIMUM	55.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW3		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	90.714	6.054	16.018
VARIANCE	256.571	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.645	S.E. SKEW	43.000
MINIMUM	65.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW4		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	106.000	6.849	18.120
VARIANCE	328.333	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.463	S.E. SKEW	45.000
MINIMUM	80.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW5		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	123.714	7.870	20.822
VARIANCE	433.571	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.103	S.E. SKEW	55.000
MINIMUM	95.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW6		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	147.143	9.674	25.596
VARIANCE	655.143	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.118	S.E. SKEW	76.000
MINIMUM	107.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

VARIABLE GEW7		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	173.571	12.394	32.792
VARIANCE	1075.286	KURTOSIS	2.000
SKEWNESS	-.334	S.E. SKEW	97.000
MINIMUM	120.000	MAXIMUM	SUM
VALID OBSERVATIONS	7	MISSING OBSERVATIONS	0

MAUSGRP: 12

VARIABLE	GEW8		
MEAN	201.857	S.E. MEAN	16.268
VARIANCE	1852.476	KURTOSIS	-.345
SKEWNESS	-.318	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	133.000	MAXIMUM	260.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW9		
MEAN	231.429	S.E. MEAN	20.433
VARIANCE	2922.619	KURTOSIS	-.631
SKEWNESS	-.393	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	145.000	MAXIMUM	300.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW10		
MEAN	260.286	S.E. MEAN	24.560
VARIANCE	4222.238	KURTOSIS	-.788
SKEWNESS	-.394	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	157.000	MAXIMUM	340.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW11		
MEAN	292.571	S.E. MEAN	28.497
VARIANCE	5634.619	KURTOSIS	-.897
SKEWNESS	-.309	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	175.000	MAXIMUM	388.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW12		
MEAN	326.143	S.E. MEAN	32.541
VARIANCE	7412.476	KURTOSIS	-.870
SKEWNESS	-.355	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	190.000	MAXIMUM	430.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW13		
MEAN	361.857	S.E. MEAN	36.575
VARIANCE	9364.143	KURTOSIS	-.916
SKEWNESS	-.315	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	210.000	MAXIMUM	475.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW14		
MEAN	399.000	S.E. MEAN	40.860
VARIANCE	11687.000	KURTOSIS	-.908
SKEWNESS	-.284	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	230.000	MAXIMUM	523.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW15		
MEAN	436.857	S.E. MEAN	44.977
VARIANCE	14160.810	KURTOSIS	-.998
SKEWNESS	-.187	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	255.000	MAXIMUM	575.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

MAUSGRP: 12

VARIABLE	GEW16			
MEAN	477.143	S.E. MEAN	49.230	STD DEV 130.250
VARIANCE	16965.143	KURTOSIS	-1.113	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.061	S.E. SKEW	.794	RANGE 353.000
MINIMUM	285.000	MAXIMUM	638.000	SUM 3340.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW17			
MEAN	519.571	S.E. MEAN	53.159	STD DEV 140.646
VARIANCE	19781.286	KURTOSIS	-1.281	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.130	S.E. SKEW	.794	RANGE 375.000
MINIMUM	325.000	MAXIMUM	700.000	SUM 3637.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW18			
MEAN	564.286	S.E. MEAN	58.436	STD DEV 154.608
VARIANCE	23903.571	KURTOSIS	-1.379	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.352	S.E. SKEW	.794	RANGE 405.000
MINIMUM	370.000	MAXIMUM	775.000	SUM 3950.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW19			
MEAN	616.143	S.E. MEAN	64.545	STD DEV 170.770
VARIANCE	29162.476	KURTOSIS	-1.374	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.569	S.E. SKEW	.794	RANGE 430.000
MINIMUM	430.000	MAXIMUM	860.000	SUM 4313.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW20			
MEAN	672.143	S.E. MEAN	73.281	STD DEV 193.883
VARIANCE	37590.476	KURTOSIS	-1.105	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.767	S.E. SKEW	.794	RANGE 475.000
MINIMUM	495.000	MAXIMUM	970.000	SUM 4705.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW21			
MEAN	733.857	S.E. MEAN	85.307	STD DEV 225.701
VARIANCE	50940.810	KURTOSIS	-.739	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.917	S.E. SKEW	.794	RANGE 575.000
MINIMUM	525.000	MAXIMUM	1100.000	SUM 5137.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW22			
MEAN	746.200	S.E. MEAN	94.697	STD DEV 211.749
VARIANCE	44837.700	KURTOSIS	1.500	S.E. KURT 2.191
SKEWNESS	1.200	S.E. SKEW	.913	RANGE 532.000
MINIMUM	553.000	MAXIMUM	1085.000	SUM 3731.000
VALID OBSERVATIONS	- 5	MISSING OBSERVATIONS - 2		

VARIABLE	GEW23			
MEAN	857.500	S.E. MEAN	122.364	STD DEV 244.728
VARIANCE	59891.667	KURTOSIS	1.814	S.E. KURT 2.582
SKEWNESS	1.074	S.E. SKEW	1.014	RANGE 580.000
MINIMUM	615.000	MAXIMUM	1195.000	SUM 3430.000
VALID OBSERVATIONS	- 4	MISSING OBSERVATIONS - 3		

MAUSGRP: 13

VARIABLE GEW0		S.E.		STD DEV
MEAN	60.000	MEAN	.000	.000
VARIANCE	.000	KURTOSIS	.	S.E. KURT
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE
MINIMUM	60.000	MAXIMUM	60.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW1		S.E.		STD DEV
MEAN	68.429	MEAN	1.541	4.077
VARIANCE	16.619	KURTOSIS	-.911	S.E. KURT
SKEWNESS	.889	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	65.000	MAXIMUM	75.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW2		S.E.		STD DEV
MEAN	79.143	MEAN	2.324	6.149
VARIANCE	37.810	KURTOSIS	.178	S.E. KURT
SKEWNESS	1.108	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	73.000	MAXIMUM	90.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW3		S.E.		STD DEV
MEAN	94.000	MEAN	3.592	9.504
VARIANCE	90.333	KURTOSIS	2.561	S.E. KURT
SKEWNESS	1.655	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	85.000	MAXIMUM	113.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW4		S.E.		STD DEV
MEAN	110.286	MEAN	5.277	13.961
VARIANCE	194.905	KURTOSIS	1.709	S.E. KURT
SKEWNESS	1.335	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	95.000	MAXIMUM	137.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW5		S.E.		STD DEV
MEAN	129.286	MEAN	7.776	20.573
VARIANCE	423.238	KURTOSIS	.121	S.E. KURT
SKEWNESS	.786	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	105.000	MAXIMUM	165.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW6		S.E.		STD DEV
MEAN	153.286	MEAN	9.872	26.120
VARIANCE	682.238	KURTOSIS	-.677	S.E. KURT
SKEWNESS	.453	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	120.000	MAXIMUM	195.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE GEW7		S.E.		STD DEV
MEAN	178.857	MEAN	12.205	34.144
VARIANCE	1165.810	KURTOSIS	-1.193	S.E. KURT
SKEWNESS	.225	S.E. SKEW	.794	RANGE
MINIMUM	135.000	MAXIMUM	230.000	SUM
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

MAUSGRP: 13

VARIABLE	GEW8		
MEAN	209.000	S.E. MEAN	16.382
VARIANCE	1878.667	KURTOSIS	-1.628
SKEWNESS	.196	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	155.000	MAXIMUM	270.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	1463.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW9		
MEAN	240.000	S.E. MEAN	19.396
VARIANCE	2633.333	KURTOSIS	-1.731
SKEWNESS	.149	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	175.000	MAXIMUM	310.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	1680.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW10		
MEAN	271.857	S.E. MEAN	22.848
VARIANCE	3654.143	KURTOSIS	-1.927
SKEWNESS	.069	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	195.000	MAXIMUM	350.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	1903.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW11		
MEAN	307.286	S.E. MEAN	25.922
VARIANCE	4703.571	KURTOSIS	-2.135
SKEWNESS	.157	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	225.000	MAXIMUM	395.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	2151.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW12		
MEAN	344.000	S.E. MEAN	29.371
VARIANCE	6038.667	KURTOSIS	-2.246
SKEWNESS	.175	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	253.000	MAXIMUM	440.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	2408.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW13		
MEAN	381.857	S.E. MEAN	32.999
VARIANCE	7622.476	KURTOSIS	-2.304
SKEWNESS	.231	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	283.000	MAXIMUM	490.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	2673.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW14		
MEAN	421.143	S.E. MEAN	36.970
VARIANCE	9567.476	KURTOSIS	-2.335
SKEWNESS	.324	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	315.000	MAXIMUM	545.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	2949.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE	GEW15		
MEAN	461.143	S.E. MEAN	41.351
VARIANCE	11969.143	KURTOSIS	-2.332
SKEWNESS	.375	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	345.000	MAXIMUM	600.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	SUM	3223.000
MISSING OBSERVATIONS - 0			

MAUSGRP: 13

VARIABLE	GEW16		
MEAN	503.857	S.E. MEAN	46.431
VARIANCE	15090.810	KURTOSIS	-2.265
SKEWNESS	.455	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	380.000	MAXIMUM	665.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW17		
MEAN	547.286	S.E. MEAN	51.397
VARIANCE	18491.905	KURTOSIS	-2.180
SKEWNESS	.510	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	415.000	MAXIMUM	730.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW18		
MEAN	592.857	S.E. MEAN	58.237
VARIANCE	23740.476	KURTOSIS	-2.048
SKEWNESS	.580	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	450.000	MAXIMUM	805.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW19		
MEAN	640.714	S.E. MEAN	67.130
VARIANCE	31545.238	KURTOSIS	-1.837
SKEWNESS	.656	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	480.000	MAXIMUM	895.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW20		
MEAN	690.429	S.E. MEAN	76.884
VARIANCE	41377.952	KURTOSIS	-1.586
SKEWNESS	.742	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	515.000	MAXIMUM	995.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE	GEW21		
MEAN	756.833	S.E. MEAN	88.991
VARIANCE	47516.567	KURTOSIS	-2.497
SKEWNESS	.362	S.E. SKEW	.845
MINIMUM	550.000	MAXIMUM	1015.000
VALID OBSERVATIONS	- 6	MISSING OBSERVATIONS	- 1

VARIABLE	GEW22		
MEAN	833.333	S.E. MEAN	115.662
VARIANCE	80266.667	KURTOSIS	-1.734
SKEWNESS	.627	S.E. SKEW	.845
MINIMUM	580.000	MAXIMUM	1240.000
VALID OBSERVATIONS	- 6	MISSING OBSERVATIONS	- 1

VARIABLE	GEW23		
MEAN	887.000	S.E. MEAN	181.863
VARIANCE	132296.000	KURTOSIS	1.019
SKEWNESS	1.311	S.E. SKEW	1.014
MINIMUM	615.000	MAXIMUM	1395.000
VALID OBSERVATIONS	- 4	MISSING OBSERVATIONS	- 3

MAUSGRP: 14

VARIABLE GEW0		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	60.000	.000		.000	
VARIANCE	.000	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	.000
MINIMUM	60.000	MAXIMUM	60.000	SUM	420.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW1		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	127.143	14.136		37.401	
VARIANCE	1398.810	KURTOSIS	2.231	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	1.289	S.E. SKEW	.794	RANGE	115.000
MINIMUM	85.000	MAXIMUM	200.000	SUM	890.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	135.286	11.109		29.392	
VARIANCE	863.905	KURTOSIS	1.001	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	1.108	S.E. SKEW	.794	RANGE	83.000
MINIMUM	107.000	MAXIMUM	190.000	SUM	947.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	114.286	12.752		33.738	
VARIANCE	1138.233	KURTOSIS	2.362	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-1.010	S.E. SKEW	.794	RANGE	110.000
MINIMUM	50.000	MAXIMUM	160.000	SUM	800.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	102.571	17.103		45.251	
VARIANCE	2047.619	KURTOSIS	2.000	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.969	S.E. SKEW	.794	RANGE	143.000
MINIMUM	17.000	MAXIMUM	160.000	SUM	718.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	102.357	18.791		49.717	
VARIANCE	2471.810	KURTOSIS	1.659	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.901	S.E. SKEW	.794	RANGE	150.000
MINIMUM	10.000	MAXIMUM	160.000	SUM	720.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW6		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	112.429	20.568		54.418	
VARIANCE	2961.286	KURTOSIS	1.502	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.559	S.E. SKEW	.794	RANGE	175.000
MINIMUM	15.000	MAXIMUM	190.000	SUM	787.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW7		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	127.143	23.356		61.794	
VARIANCE	3818.476	KURTOSIS	1.384	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.156	S.E. SKEW	.794	RANGE	202.000
MINIMUM	23.000	MAXIMUM	225.000	SUM	890.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

MAUSGRP: 14

VARIABLE	GEW8		
MEAN	145.857	S.E. MEAN	26.651
VARIANCE	4971.810	KURTOSIS	1.608
SKEWNESS	.036	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	30.000	MAXIMUM	263.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1021.000
		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE	GEW9		
MEAN	164.429	S.E. MEAN	30.755
VARIANCE	6620.952	KURTOSIS	1.444
SKEWNESS	.087	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	33.000	MAXIMUM	300.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1151.000
		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE	GEW10		
MEAN	186.143	S.E. MEAN	35.110
VARIANCE	8629.143	KURTOSIS	1.230
SKEWNESS	.097	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	38.000	MAXIMUM	340.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1303.000
		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE	GEW11		
MEAN	205.429	S.E. MEAN	38.885
VARIANCE	10584.286	KURTOSIS	.836
SKEWNESS	-.292	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	33.000	MAXIMUM	360.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1438.000
		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE	GEW12		
MEAN	268.833	S.E. MEAN	40.058
VARIANCE	9627.767	KURTOSIS	1.118
SKEWNESS	.901	S.E. SKEW	.845
MINIMUM	150.000	MAXIMUM	435.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1613.000
		MISSING OBSERVATIONS - 1	

VARIABLE	GEW13		
MEAN	298.833	S.E. MEAN	46.167
VARIANCE	12788.167	KURTOSIS	1.152
SKEWNESS	.862	S.E. SKEW	.845
MINIMUM	160.000	MAXIMUM	490.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1793.300
		MISSING OBSERVATIONS - 1	

VARIABLE	GEW14		
MEAN	327.833	S.E. MEAN	51.917
VARIANCE	16172.167	KURTOSIS	1.131
SKEWNESS	.731	S.E. SKEW	.845
MINIMUM	165.000	MAXIMUM	540.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	1967.000
		MISSING OBSERVATIONS - 1	

VARIABLE	GEW15		
MEAN	359.500	S.E. MEAN	58.303
VARIANCE	20395.500	KURTOSIS	1.385
SKEWNESS	.746	S.E. SKEW	.845
MINIMUM	175.000	MAXIMUM	600.000
VALID OBSERVATIONS	-	SUM	2157.000
		MISSING OBSERVATIONS - 1	

MAUSGRP: 14

```

-----
VARIABLE  GEW16
MEAN      386.667      S.E. MEAN 65.823      STD DEV   161.234
VARIANCE  25996.267    KURTOSIS  1.723      S.E. KURT  2.060
SKEWNESS  .843        S.E. SKEW .845      RANGE     483.000
MINIMUM   180.000     MAXIMUM   663.000     SUM       2320.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW17
MEAN      415.833      S.E. MEAN 74.426      STD DEV   182.307
VARIANCE  33235.767    KURTOSIS  2.014      S.E. KURT  2.060
SKEWNESS  1.016       S.E. SKEW .845      RANGE     545.000
MINIMUM   190.000     MAXIMUM   735.000     SUM       2495.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW18
MEAN      440.833      S.E. MEAN 85.131      STD DEV   208.528
VARIANCE  43483.767    KURTOSIS  2.348      S.E. KURT  2.060
SKEWNESS  1.232       S.E. SKEW .845      RANGE     618.000
MINIMUM   197.000     MAXIMUM   815.000     SUM       2645.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW19
MEAN      467.500      S.E. MEAN 98.258      STD DEV   240.681
VARIANCE  57927.500    KURTOSIS  2.448      S.E. KURT  2.060
SKEWNESS  1.366       S.E. SKEW .845      RANGE     700.000
MINIMUM   205.000     MAXIMUM   905.000     SUM       2805.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW20
MEAN      496.333      S.E. MEAN 112.875     STD DEV   276.486
VARIANCE  76444.667    KURTOSIS  2.366      S.E. KURT  2.060
SKEWNESS  1.401       S.E. SKEW .845      RANGE     785.000
MINIMUM   215.000     MAXIMUM   1000.000    SUM       2978.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW21
MEAN      525.500      S.E. MEAN 129.455     STD DEV   317.079
VARIANCE  100551.500   KURTOSIS  2.382      S.E. KURT  2.060
SKEWNESS  1.430       S.E. SKEW .845      RANGE     877.000
MINIMUM   228.000     MAXIMUM   1105.000    SUM       3153.000
VALID OBSERVATIONS - 6 MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW22
STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW23
STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.
-----

```

MAUSGRP: 15

VARIABLE GEW0		S.E.	MEAN	.000	STD DEV	.000
MEAN	60.000					
VARIANCE	.000		KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.		S.E. SKEW	.	RANGE	.000
MINIMUM	60.000		MAXIMUM	60.000	SUM	420.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW1		S.E.	MEAN	15.459	STD DEV	40.900
MEAN	119.143					
VARIANCE	1672.810		KURTOSIS	-1.076	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.243		S.E. SKEW	.794	RANGE	117.000
MINIMUM	63.000		MAXIMUM	180.000	SUM	834.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2		S.E.	MEAN	11.488	STD DEV	30.394
MEAN	127.143					
VARIANCE	923.810		KURTOSIS	3.543	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-1.596		S.E. SKEW	.794	RANGE	95.000
MINIMUM	65.000		MAXIMUM	160.000	SUM	890.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E.	MEAN	10.708	STD DEV	28.331
MEAN	121.571					
VARIANCE	802.619		KURTOSIS	.819	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-1.044		S.E. SKEW	.794	RANGE	83.000
MINIMUM	70.000		MAXIMUM	153.000	SUM	851.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E.	MEAN	14.123	STD DEV	37.367
MEAN	112.571					
VARIANCE	1396.286		KURTOSIS	-1.229	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.566		S.E. SKEW	.794	RANGE	95.000
MINIMUM	70.000		MAXIMUM	165.000	SUM	788.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E.	MEAN	17.240	STD DEV	45.612
MEAN	109.143					
VARIANCE	2080.476		KURTOSIS	-.770	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.659		S.E. SKEW	.794	RANGE	127.000
MINIMUM	55.000		MAXIMUM	182.000	SUM	764.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW6		S.E.	MEAN	19.106	STD DEV	50.548
MEAN	112.857					
VARIANCE	2555.143		KURTOSIS	-.579	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.474		S.E. SKEW	.794	RANGE	145.000
MINIMUM	50.000		MAXIMUM	195.000	SUM	790.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW7		S.E.	MEAN	20.887	STD DEV	55.263
MEAN	118.429					
VARIANCE	3053.952		KURTOSIS	-.545	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.318		S.E. SKEW	.794	RANGE	160.000
MINIMUM	47.000		MAXIMUM	207.000	SUM	829.000
VALID OBSERVATIONS -		7	MISSING OBSERVATIONS - 0			

MAUSGRP: 15

VARIABLE	GEW8			
MEAN	125.571	S.E. MEAN	21.375	STD DEV 56.553
VARIANCE	3198.286	KURTOSIS	-.476	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.260	S.E. SKEW	.794	RANGE 165.000
MINIMUM	50.000	MAXIMUM	215.000	SUM 879.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW9			
MEAN	134.143	S.E. MEAN	21.872	STD DEV 57.869
VARIANCE	3348.810	KURTOSIS	-.535	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.277	S.E. SKEW	.794	RANGE 168.000
MINIMUM	57.000	MAXIMUM	225.000	SUM 939.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW10			
MEAN	145.143	S.E. MEAN	22.527	STD DEV 59.600
VARIANCE	3552.143	KURTOSIS	-.888	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.185	S.E. SKEW	.794	RANGE 170.000
MINIMUM	65.000	MAXIMUM	235.000	SUM 1016.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW11			
MEAN	156.143	S.E. MEAN	23.762	STD DEV 62.869
VARIANCE	3952.476	KURTOSIS	-1.097	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.172	S.E. SKEW	.794	RANGE 177.000
MINIMUM	73.000	MAXIMUM	250.000	SUM 1093.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW12			
MEAN	171.000	S.E. MEAN	25.566	STD DEV 67.641
VARIANCE	4575.333	KURTOSIS	-1.539	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.054	S.E. SKEW	.794	RANGE 185.000
MINIMUM	80.000	MAXIMUM	265.000	SUM 1197.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW13			
MEAN	187.143	S.E. MEAN	28.414	STD DEV 75.176
VARIANCE	5651.476	KURTOSIS	-1.838	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.214	S.E. SKEW	.794	RANGE 199.000
MINIMUM	86.000	MAXIMUM	285.000	SUM 1310.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW14			
MEAN	207.429	S.E. MEAN	32.834	STD DEV 86.869
VARIANCE	7546.286	KURTOSIS	-2.087	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.225	S.E. SKEW	.794	RANGE 215.000
MINIMUM	95.000	MAXIMUM	310.000	SUM 1452.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW15			
MEAN	231.429	S.E. MEAN	38.394	STD DEV 101.582
VARIANCE	10318.952	KURTOSIS	-1.942	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.076	S.E. SKEW	.794	RANGE 248.000
MINIMUM	107.000	MAXIMUM	355.000	SUM 1620.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

MAUSGRP: 15

VARIABLE GEW16		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	236.714	36.172	95.702
VARIANCE	9158.905	KURTOSIS -1.474	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.126	S.E. SKEW .794	RANGE 253.000
MINIMUM	117.000	MAXIMUM 370.000	SUM 1657.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW17		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	245.714	38.523	101.923
VARIANCE	10388.238	KURTOSIS -.562	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.376	S.E. SKEW .794	RANGE 280.000
MINIMUM	130.000	MAXIMUM 410.000	SUM 1720.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW18		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	258.571	42.534	112.536
VARIANCE	12664.286	KURTOSIS -.448	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.579	S.E. SKEW .794	RANGE 310.000
MINIMUM	135.000	MAXIMUM 445.000	SUM 1810.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW19		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	275.857	46.214	122.271
VARIANCE	14950.143	KURTOSIS -.269	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.683	S.E. SKEW .794	RANGE 340.000
MINIMUM	143.000	MAXIMUM 483.000	SUM 1931.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW20		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	295.714	50.033	132.375
VARIANCE	17523.238	KURTOSIS .039	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.755	S.E. SKEW .794	RANGE 375.000
MINIMUM	150.000	MAXIMUM 525.000	SUM 2070.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW21		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	318.143	53.418	141.330
VARIANCE	19974.143	KURTOSIS .237	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.746	S.E. SKEW .794	RANGE 408.000
MINIMUM	157.000	MAXIMUM 565.000	SUM 2227.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW22		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	345.000	56.358	149.108
VARIANCE	22233.333	KURTOSIS .408	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.661	S.E. SKEW .794	RANGE 440.000
MINIMUM	165.000	MAXIMUM 605.000	SUM 2415.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

VARIABLE GEW23		S.E. MEAN	STD DEV
MEAN	374.571	59.287	156.858
VARIANCE	24604.286	KURTOSIS .478	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.526	S.E. SKEW .794	RANGE 470.000
MINIMUM	175.000	MAXIMUM 645.000	SUM 2622.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0	

MAUSGRP: 16

VARIABLE	GEW0			
MEAN	60.000	S.E. MEAN	.000	STD DEV .000
VARIANCE	.000	KURTOSIS	.	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE .000
MINIMUM	60.000	MAXIMUM	60.000	SUM 420.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW1			
MEAN	155.286	S.E. MEAN	6.872	STD DEV 18.182
VARIANCE	330.571	KURTOSIS	-.598	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.278	S.E. SKEW	.794	RANGE 53.000
MINIMUM	127.000	MAXIMUM	180.000	SUM 1087.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW2			
MEAN	122.857	S.E. MEAN	9.503	STD DEV 25.142
VARIANCE	632.143	KURTOSIS	.072	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.475	S.E. SKEW	.794	RANGE 75.000
MINIMUM	90.000	MAXIMUM	165.000	SUM 860.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW3			
MEAN	97.143	S.E. MEAN	8.905	STD DEV 23.561
VARIANCE	555.143	KURTOSIS	.680	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.142	S.E. SKEW	.794	RANGE 65.000
MINIMUM	75.000	MAXIMUM	140.000	SUM 680.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW4			
MEAN	90.571	S.E. MEAN	6.279	STD DEV 16.612
VARIANCE	275.952	KURTOSIS	.229	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.177	S.E. SKEW	.794	RANGE 45.000
MINIMUM	75.000	MAXIMUM	120.000	SUM 634.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW5			
MEAN	92.000	S.E. MEAN	4.880	STD DEV 12.910
VARIANCE	166.667	KURTOSIS	-.931	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.810	S.E. SKEW	.794	RANGE 33.000
MINIMUM	77.000	MAXIMUM	110.000	SUM 644.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW6			
MEAN	97.286	S.E. MEAN	5.098	STD DEV 13.487
VARIANCE	181.905	KURTOSIS	-.137	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.590	S.E. SKEW	.794	RANGE 40.000
MINIMUM	80.000	MAXIMUM	120.000	SUM 681.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

VARIABLE	GEW7			
MEAN	104.429	S.E. MEAN	6.803	STD DEV 17.999
VARIANCE	323.952	KURTOSIS	-.306	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.004	S.E. SKEW	.794	RANGE 48.000
MINIMUM	87.000	MAXIMUM	135.000	SUM 731.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS - 0		

MAUSGRP: 16

VARIABLE	GEW8			
MEAN	114.000	S.E. MEAN	9.774	STD DEV 25.859
VARIANCE	668.667	KURTOSIS	.174	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.254	S.E. SKEW	.794	RANGE 65.000
MINIMUM	95.000	MAXIMUM	160.000	SUM 798.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW9			
MEAN	124.429	S.E. MEAN	13.341	STD DEV 35.298
VARIANCE	1245.952	KURTOSIS	-.249	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.179	S.E. SKEW	.794	RANGE 90.000
MINIMUM	95.000	MAXIMUM	185.000	SUM 871.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW10			
MEAN	137.571	S.E. MEAN	17.474	STD DEV 46.231
VARIANCE	2137.286	KURTOSIS	-.475	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.115	S.E. SKEW	.794	RANGE 118.000
MINIMUM	97.000	MAXIMUM	215.000	SUM 963.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW11			
MEAN	150.571	S.E. MEAN	21.451	STD DEV 56.753
VARIANCE	3220.952	KURTOSIS	-.543	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.084	S.E. SKEW	.794	RANGE 145.000
MINIMUM	100.000	MAXIMUM	245.000	SUM 1054.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW12			
MEAN	166.714	S.E. MEAN	25.441	STD DEV 67.310
VARIANCE	4530.571	KURTOSIS	-.448	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	1.064	S.E. SKEW	.794	RANGE 175.000
MINIMUM	105.000	MAXIMUM	280.000	SUM 1167.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW13			
MEAN	184.286	S.E. MEAN	28.427	STD DEV 75.210
VARIANCE	5656.571	KURTOSIS	-.497	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.996	S.E. SKEW	.794	RANGE 198.000
MINIMUM	112.000	MAXIMUM	310.000	SUM 1290.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW14			
MEAN	204.143	S.E. MEAN	32.482	STD DEV 85.939
VARIANCE	7385.476	KURTOSIS	-.518	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.931	S.E. SKEW	.794	RANGE 227.000
MINIMUM	120.000	MAXIMUM	347.000	SUM 1429.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

VARIABLE	GEW15			
MEAN	226.714	S.E. MEAN	35.792	STD DEV 94.696
VARIANCE	8967.238	KURTOSIS	-.605	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.821	S.E. SKEW	.794	RANGE 252.000
MINIMUM	130.000	MAXIMUM	382.000	SUM 1587.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0	

MAUSGRP: 16

VARIABLE GEW16			
MEAN	252.143	S.E. MEAN	39.729
VARIANCE	11048.810	KURTOSIS	-.786
SKEWNESS	.667	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	140.000	MAXIMUM	420.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW17			
MEAN	279.286	S.E. MEAN	43.813
VARIANCE	13436.905	KURTOSIS	-.903
SKEWNESS	.507	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	150.000	MAXIMUM	460.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW18			
MEAN	309.000	S.E. MEAN	48.209
VARIANCE	16268.667	KURTOSIS	-.926
SKEWNESS	.369	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	160.000	MAXIMUM	505.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW19			
MEAN	342.857	S.E. MEAN	52.744
VARIANCE	19473.810	KURTOSIS	-1.091
SKEWNESS	.229	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	175.000	MAXIMUM	550.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW20			
MEAN	377.429	S.E. MEAN	57.229
VARIANCE	22926.286	KURTOSIS	-1.184
SKEWNESS	.099	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	190.000	MAXIMUM	595.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW21			
MEAN	416.429	S.E. MEAN	61.562
VARIANCE	26528.952	KURTOSIS	-1.285
SKEWNESS	-.052	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	207.000	MAXIMUM	640.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW22			
MEAN	459.571	S.E. MEAN	66.336
VARIANCE	30802.952	KURTOSIS	-1.266
SKEWNESS	-.152	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	225.000	MAXIMUM	695.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

VARIABLE GEW23			
MEAN	505.000	S.E. MEAN	71.389
VARIANCE	35675.000	KURTOSIS	-1.237
SKEWNESS	-.278	S.E. SKEW	.794
MINIMUM	240.000	MAXIMUM	750.000
VALID OBSERVATIONS	- 7	MISSING OBSERVATIONS	- 0

MAUSGRP: 21

VARIABLE GEW1		S.E.		STD DEV	
MEAN	2.090	MEAN	.149	STD DEV	.472
VARIANCE	.223	KURTOSIS	.333	S.E. KURT	1.942
SKEWNESS	-.309	S.E. SKEW	.687	RANGE	1.600
MINIMUM	1.300	MAXIMUM	2.900	SUM	20.900
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2		S.E.		STD DEV	
MEAN	3.530	MEAN	.187	STD DEV	.591
VARIANCE	.349	KURTOSIS	.078	S.E. KURT	1.942
SKEWNESS	-.573	S.E. SKEW	.687	RANGE	2.000
MINIMUM	2.400	MAXIMUM	4.400	SUM	35.300
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E.		STD DEV	
MEAN	4.760	MEAN	.224	STD DEV	.709
VARIANCE	.503	KURTOSIS	-.212	S.E. KURT	1.942
SKEWNESS	-.561	S.E. SKEW	.687	RANGE	2.300
MINIMUM	3.400	MAXIMUM	5.700	SUM	47.600
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E.		STD DEV	
MEAN	5.890	MEAN	.274	STD DEV	.866
VARIANCE	.750	KURTOSIS	-.291	S.E. KURT	1.942
SKEWNESS	-.441	S.E. SKEW	.687	RANGE	2.700
MINIMUM	4.300	MAXIMUM	7.000	SUM	58.900
VALID OBSERVATIONS - 10		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E.		STD DEV	
MEAN	7.844	MEAN	.362	STD DEV	1.085
VARIANCE	1.178	KURTOSIS	-.765	S.E. KURT	1.952
SKEWNESS	-.140	S.E. SKEW	.717	RANGE	3.300
MINIMUM	6.200	MAXIMUM	9.500	SUM	70.600
VALID OBSERVATIONS - 9		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW6		S.E.		STD DEV	
MEAN	8.960	MEAN	.588	STD DEV	1.315
VARIANCE	1.728	KURTOSIS	.767	S.E. KURT	2.191
SKEWNESS	.987	S.E. SKEW	.913	RANGE	3.200
MINIMUM	7.800	MAXIMUM	11.000	SUM	44.800
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 5			

VARIABLE GEW7		S.E.		STD DEV	
MEAN	11.700	MEAN	1.400	STD DEV	1.980
VARIANCE	3.920	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	2.800
MINIMUM	10.300	MAXIMUM	13.100	SUM	23.400
VALID OBSERVATIONS - 2		MISSING OBSERVATIONS - 8			

VARIABLE GEW8		S.E.		STD DEV	
MEAN	13.400	MEAN	1.800	STD DEV	2.546
VARIANCE	6.480	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	3.600
MINIMUM	11.600	MAXIMUM	15.200	SUM	26.800
VALID OBSERVATIONS - 2		MISSING OBSERVATIONS - 8			

MAUSGRP: 21

VARIABLE GEW9					
MEAN	15.000	S.E. MEAN	2.200	STD DEV	3.111
VARIANCE	9.680	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	4.400
MINIMUM	12.800	MAXIMUM	17.200	SUM	30.000
VALID OBSERVATIONS -		2	MISSING OBSERVATIONS - 8		

VARIABLE GEW10					
MEAN	16.500	S.E. MEAN	2.500	STD DEV	3.536
VARIANCE	12.500	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	5.000
MINIMUM	14.000	MAXIMUM	19.000	SUM	33.000
VALID OBSERVATIONS -		2	MISSING OBSERVATIONS - 8		

VARIABLE GEW11					
MEAN	17.950	S.E. MEAN	2.650	STD DEV	3.748
VARIANCE	14.045	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	5.300
MINIMUM	15.300	MAXIMUM	20.600	SUM	35.900
VALID OBSERVATIONS -		2	MISSING OBSERVATIONS - 8		

VARIABLE GEW12					
MEAN	19.200	S.E. MEAN	2.700	STD DEV	3.818
VARIANCE	14.580	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	5.400
MINIMUM	16.500	MAXIMUM	21.900	SUM	38.400
VALID OBSERVATIONS -		2	MISSING OBSERVATIONS - 8		

VARIABLE GEW13					
MEAN	20.350	S.E. MEAN	2.550	STD DEV	3.606
VARIANCE	13.005	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	5.100
MINIMUM	17.800	MAXIMUM	22.900	SUM	40.700
VALID OBSERVATIONS -		2	MISSING OBSERVATIONS - 8		

VARIABLE GEW14					
MEAN	21.450	S.E. MEAN	2.450	STD DEV	3.465
VARIANCE	12.005	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	4.900
MINIMUM	19.000	MAXIMUM	23.900	SUM	42.900
VALID OBSERVATIONS -		2	MISSING OBSERVATIONS - 8		

VARIABLE GEW15
STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.

MAUSGRP: 22

VARIABLE GEW1		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	3.071		.398		1.053
VARIANCE	1.109	KURTOSIS	-1.256	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.660	S.E. SKEW	.794	RANGE	2.600
MINIMUM	1.900	MAXIMUM	4.500	SUM	21.500
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	4.914		.438		1.158
VARIANCE	1.341	KURTOSIS	.481	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.918	S.E. SKEW	.794	RANGE	3.200
MINIMUM	3.800	MAXIMUM	7.000	SUM	34.400
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	6.429		.547		1.447
VARIANCE	2.092	KURTOSIS	2.568	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	1.436	S.E. SKEW	.794	RANGE	4.300
MINIMUM	5.000	MAXIMUM	9.300	SUM	45.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	7.686		.700		1.852
VARIANCE	3.431	KURTOSIS	2.736	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	1.564	S.E. SKEW	.794	RANGE	5.500
MINIMUM	5.900	MAXIMUM	11.400	SUM	53.800
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	9.871		.889		2.352
VARIANCE	5.532	KURTOSIS	1.758	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	1.302	S.E. SKEW	.794	RANGE	6.900
MINIMUM	7.500	MAXIMUM	14.400	SUM	69.100
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW6		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	11.686		.979		2.590
VARIANCE	6.708	KURTOSIS	.642	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.995	S.E. SKEW	.794	RANGE	7.400
MINIMUM	9.000	MAXIMUM	16.400	SUM	81.800
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW7		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	13.329		.993		2.628
VARIANCE	6.906	KURTOSIS	-0.571	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.615	S.E. SKEW	.794	RANGE	7.300
MINIMUM	10.400	MAXIMUM	17.700	SUM	93.300
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW8		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	14.886		1.011		2.675
VARIANCE	7.155	KURTOSIS	-1.557	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.261	S.E. SKEW	.794	RANGE	7.000
MINIMUM	11.800	MAXIMUM	18.800	SUM	104.200
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

MAUSGRP: 22

```

-----
VARIABLE  GEW9
MEAN      16.457      S.E. MEAN  1.080      STD DEV   2.856
VARIANCE  8.160      KURTOSIS  -2.148      S.E. KURT 2.000
SKEWNESS  -.007      S.E. SKEW  .794      RANGE     6.700
MINIMUM   13.100     MAXIMUM   19.800     SUM       115.200
VALID OBSERVATIONS - 7      MISSING OBSERVATIONS - 0
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW10
MEAN      17.433      S.E. MEAN  1.251      STD DEV   3.064
VARIANCE  9.387      KURTOSIS  -1.830      S.E. KURT 2.060
SKEWNESS  .346      S.E. SKEW  .845      RANGE     7.200
MINIMUM   14.300     MAXIMUM   21.500     SUM       104.600
VALID OBSERVATIONS - 6      MISSING OBSERVATIONS - 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW11
MEAN      18.060      S.E. MEAN  1.319      STD DEV   2.948
VARIANCE  8.693      KURTOSIS  .112      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  .822      S.E. SKEW  .913      RANGE     7.200
MINIMUM   15.300     MAXIMUM   22.500     SUM       90.300
VALID OBSERVATIONS - 5      MISSING OBSERVATIONS - 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW12
MEAN      19.340      S.E. MEAN  1.477      STD DEV   3.303
VARIANCE  10.908     KURTOSIS  .831      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  1.064      S.E. SKEW  .913      RANGE     8.100
MINIMUM   16.400     MAXIMUM   24.500     SUM       96.700
VALID OBSERVATIONS - 5      MISSING OBSERVATIONS - 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW13
MEAN      20.700      S.E. MEAN  1.698      STD DEV   3.796
VARIANCE  14.410     KURTOSIS  .829      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  .989      S.E. SKEW  .913      RANGE     9.400
MINIMUM   17.200     MAXIMUM   26.600     SUM       103.500
VALID OBSERVATIONS - 5      MISSING OBSERVATIONS - 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW14
MEAN      22.060      S.E. MEAN  1.924      STD DEV   4.303
VARIANCE  18.513     KURTOSIS  .644      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  .954      S.E. SKEW  .913      RANGE     10.600
MINIMUM   18.100     MAXIMUM   28.700     SUM       110.300
VALID OBSERVATIONS - 5      MISSING OBSERVATIONS - 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW15
STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.
-----

```

MAUSGRP: 23

VARIABLE GEW1		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	2.829		.201		.531
VARIANCE	.282	KURTOSIS	-.492	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.745	S.E. SKEW	.794	RANGE	1.500
MINIMUM	2.000	MAXIMUM	3.500	SUM	19.800
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	4.671		.339		.898
VARIANCE	.806	KURTOSIS	-.250	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.130	S.E. SKEW	.794	RANGE	2.700
MINIMUM	3.300	MAXIMUM	6.000	SUM	32.700
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	6.114		.428		1.132
VARIANCE	1.281	KURTOSIS	-.748	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.093	S.E. SKEW	.794	RANGE	3.300
MINIMUM	4.500	MAXIMUM	7.800	SUM	42.800
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	7.914		.879		2.325
VARIANCE	5.405	KURTOSIS	1.749	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	1.365	S.E. SKEW	.794	RANGE	6.800
MINIMUM	5.500	MAXIMUM	12.300	SUM	54.700
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	9.329		.626		1.656
VARIANCE	2.742	KURTOSIS	-1.738	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.190	S.E. SKEW	.794	RANGE	4.300
MINIMUM	7.300	MAXIMUM	11.600	SUM	65.300
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW6		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	11.100		.715		1.892
VARIANCE	3.580	KURTOSIS	-2.031	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.009	S.E. SKEW	.794	RANGE	4.700
MINIMUM	8.800	MAXIMUM	13.500	SUM	77.700
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW7		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	12.800		.803		2.125
VARIANCE	4.517	KURTOSIS	-2.235	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.128	S.E. SKEW	.794	RANGE	5.200
MINIMUM	10.200	MAXIMUM	15.400	SUM	89.600
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW8		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	14.429		.903		2.390
VARIANCE	5.712	KURTOSIS	-2.449	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.245	S.E. SKEW	.794	RANGE	5.600
MINIMUM	11.600	MAXIMUM	17.200	SUM	101.000
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

MAUSGRP: 23

```

-----
VARIABLE  GEW9
MEAN      16.043      S.E. MEAN  1.032      STD DEV   2.729
VARIANCE  7.450      KURTOSIS  -2.559      S.E. KURT 2.000
SKEWNESS  -.316      S.E. SKEW  .794      RANGE     6.200
MINIMUM   12.800      MAXIMUM   19.000      SUM       112.300
VALID OBSERVATIONS = 7      MISSING OBSERVATIONS = 0
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW10
MEAN      17.643      S.E. MEAN  1.173      STD DEV   3.103
VARIANCE  9.626      KURTOSIS  -2.573      S.E. KURT 2.000
SKEWNESS  -.364      S.E. SKEW  .794      RANGE     6.900
MINIMUM   13.900      MAXIMUM   20.800      SUM       123.500
VALID OBSERVATIONS = 7      MISSING OBSERVATIONS = 0
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW11
MEAN      18.700      S.E. MEAN  1.465      STD DEV   3.589
VARIANCE  12.884      KURTOSIS  -3.052      S.E. KURT 2.060
SKEWNESS  -.028      S.E. SKEW  .845      RANGE     7.600
MINIMUM   14.900      MAXIMUM   22.500      SUM       112.200
VALID OBSERVATIONS = 6      MISSING OBSERVATIONS = 1
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW12
MEAN      19.560      S.E. MEAN  1.856      STD DEV   4.150
VARIANCE  17.223      KURTOSIS  -3.196      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  .508      S.E. SKEW  .913      RANGE     8.300
MINIMUM   15.900      MAXIMUM   24.200      SUM       97.800
VALID OBSERVATIONS = 5      MISSING OBSERVATIONS = 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW13
MEAN      20.940      S.E. MEAN  2.039      STD DEV   4.558
VARIANCE  20.778      KURTOSIS  -3.174      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  .467      S.E. SKEW  .913      RANGE     9.100
MINIMUM   16.800      MAXIMUM   25.900      SUM       104.700
VALID OBSERVATIONS = 5      MISSING OBSERVATIONS = 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW14
MEAN      22.280      S.E. MEAN  2.237      STD DEV   5.002
VARIANCE  25.022      KURTOSIS  -3.145      S.E. KURT 2.191
SKEWNESS  .445      S.E. SKEW  .913      RANGE     10.100
MINIMUM   17.700      MAXIMUM   27.800      SUM       111.400
VALID OBSERVATIONS = 5      MISSING OBSERVATIONS = 2
-----

```

```

-----
VARIABLE  GEW15
STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.
-----

```

MAUSGRP: 24

VARIABLE GEW1		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	3.900		.777		1.903
VARIANCE	3.620		KURTOSIS -1.417		S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	-.720		S.E. SKEW .845		RANGE 4.600
MINIMUM	1.100		MAXIMUM 5.700		SUM 23.400
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	6.050		.905		2.217
VARIANCE	4.915		KURTOSIS -.672		S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	-.405		S.E. SKEW .845		RANGE 6.100
MINIMUM	2.800		MAXIMUM 8.900		SUM 36.300
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	7.900		1.032		2.529
VARIANCE	6.396		KURTOSIS .586		S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	.392		S.E. SKEW .845		RANGE 7.400
MINIMUM	4.500		MAXIMUM 11.900		SUM 47.400
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	9.800		1.381		3.382
VARIANCE	11.436		KURTOSIS 2.259		S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	1.094		S.E. SKEW .845		RANGE 10.100
MINIMUM	5.700		MAXIMUM 15.800		SUM 58.800
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	12.667		1.997		4.893
VARIANCE	23.939		KURTOSIS 3.247		S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	1.527		S.E. SKEW .845		RANGE 14.400
MINIMUM	7.400		MAXIMUM 21.800		SUM 76.000
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW6		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	14.800		2.231		5.466
VARIANCE	29.876		KURTOSIS 2.889		S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	1.464		S.E. SKEW .845		RANGE 15.900
MINIMUM	9.000		MAXIMUM 24.900		SUM 88.800
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW7		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	14.660		1.348		3.014
VARIANCE	9.083		KURTOSIS -.988		S.E. KURT 2.191
SKEWNESS	-.346		S.E. SKEW .913		RANGE 7.500
MINIMUM	10.500		MAXIMUM 18.000		SUM 73.300
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW8		S.E. MEAN		STD DEV	
MEAN	16.725		1.975		3.950
VARIANCE	15.602		KURTOSIS -.770		S.E. KURT 2.582
SKEWNESS	-.569		S.E. SKEW 1.014		RANGE 9.100
MINIMUM	11.700		MAXIMUM 20.800		SUM 66.900
VALID OBSERVATIONS - 4		MISSING OBSERVATIONS - 2			

MAUSGRP: 24

VARIABLE GEW9					
MEAN	18.425	S.E. MEAN	2.247	STD DEV	4.494
VARIANCE	20.196	KURTOSIS	-.381	S.E. KURT	2.582
SKEWNESS	-.258	S.E. SKEW	1.014	RANGE	10.600
MINIMUM	12.900	MAXIMUM	23.500	SUM	73.700
VALID OBSERVATIONS - 4		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW10					
MEAN	20.175	S.E. MEAN	2.542	STD DEV	5.085
VARIANCE	25.856	KURTOSIS	.345	S.E. KURT	2.582
SKEWNESS	-.081	S.E. SKEW	1.014	RANGE	12.200
MINIMUM	14.000	MAXIMUM	26.200	SUM	80.700
VALID OBSERVATIONS - 4		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW11					
MEAN	21.900	S.E. MEAN	2.859	STD DEV	5.717
VARIANCE	32.687	KURTOSIS	1.066	S.E. KURT	2.582
SKEWNESS	.051	S.E. SKEW	1.014	RANGE	13.900
MINIMUM	15.000	MAXIMUM	28.900	SUM	87.600
VALID OBSERVATIONS - 4		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW12					
MEAN	21.100	S.E. MEAN	2.601	STD DEV	4.504
VARIANCE	20.290	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	-1.728	S.E. SKEW	1.225	RANGE	7.900
MINIMUM	15.900	MAXIMUM	23.800	SUM	63.300
VALID OBSERVATIONS - 3		MISSING OBSERVATIONS - 3			

VARIABLE GEW13					
MEAN	20.800	S.E. MEAN	4.000	STD DEV	5.657
VARIANCE	32.000	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	8.000
MINIMUM	16.800	MAXIMUM	24.800	SUM	41.600
VALID OBSERVATIONS - 2		MISSING OBSERVATIONS - 4			

VARIABLE GEW14					
MEAN	21.700	S.E. MEAN	4.100	STD DEV	5.798
VARIANCE	33.620	KURTOSIS	.	S.E. KURT	.
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE	8.200
MINIMUM	17.600	MAXIMUM	25.800	SUM	43.400
VALID OBSERVATIONS - 2		MISSING OBSERVATIONS - 4			

VARIABLE GEW15
 STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
 VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.

MAUSGRP: 25

VARIABLE GEW1					
MEAN	6.600	S.E. MEAN	1.664	STD DEV	4.402
VARIANCE	19.373	KURTOSIS	-.629	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	.186	S.E. SKEW	.794	RANGE	12.600
MINIMUM	.800	MAXIMUM	13.400	SUM	46.200
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW2					
MEAN	9.614	S.E. MEAN	1.989	STD DEV	5.263
VARIANCE	27.698	KURTOSIS	-1.344	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.225	S.E. SKEW	.794	RANGE	14.300
MINIMUM	1.900	MAXIMUM	16.200	SUM	67.300
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3					
MEAN	12.086	S.E. MEAN	2.351	STD DEV	6.221
VARIANCE	38.701	KURTOSIS	-1.324	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.101	S.E. SKEW	.794	RANGE	16.800
MINIMUM	3.200	MAXIMUM	20.000	SUM	84.600
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4					
MEAN	14.300	S.E. MEAN	2.488	STD DEV	6.582
VARIANCE	43.317	KURTOSIS	-1.145	S.E. KURT	2.000
SKEWNESS	-.035	S.E. SKEW	.794	RANGE	18.400
MINIMUM	4.900	MAXIMUM	23.300	SUM	100.100
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5					
MEAN	16.817	S.E. MEAN	2.141	STD DEV	5.245
VARIANCE	27.510	KURTOSIS	-1.319	S.E. KURT	2.060
SKEWNESS	.310	S.E. SKEW	.845	RANGE	13.900
MINIMUM	10.400	MAXIMUM	24.300	SUM	100.900
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW6					
MEAN	19.650	S.E. MEAN	1.969	STD DEV	4.823
VARIANCE	23.259	KURTOSIS	.143	S.E. KURT	2.060
SKEWNESS	.539	S.E. SKEW	.845	RANGE	13.700
MINIMUM	13.600	MAXIMUM	27.300	SUM	117.900
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW7					
MEAN	22.067	S.E. MEAN	2.021	STD DEV	4.951
VARIANCE	24.515	KURTOSIS	1.432	S.E. KURT	2.060
SKEWNESS	.701	S.E. SKEW	.845	RANGE	14.700
MINIMUM	15.700	MAXIMUM	30.400	SUM	132.400
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW8					
MEAN	24.350	S.E. MEAN	2.234	STD DEV	5.473
VARIANCE	29.951	KURTOSIS	1.028	S.E. KURT	2.060
SKEWNESS	.690	S.E. SKEW	.845	RANGE	16.100
MINIMUM	17.300	MAXIMUM	33.400	SUM	146.100
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

MAUSGRP: 25

VARIABLE GEW9				
MEAN	24.540	S.E. MEAN	2.000	STD DEV 4.471
VARIANCE	19.993	KURTOSIS	2.093	S.E. KURT 2.191
SKEWNESS	.663	S.E. SKEW	.913	RANGE 12.500
MINIMUM	18.900	MAXIMUM	31.400	SUM 122.700
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 2		

VARIABLE GEW10				
MEAN	26.850	S.E. MEAN	3.252	STD DEV 6.504
VARIANCE	42.297	KURTOSIS	2.234	S.E. KURT 2.582
SKEWNESS	1.135	S.E. SKEW	1.014	RANGE 15.500
MINIMUM	20.400	MAXIMUM	35.900	SUM 107.400
VALID OBSERVATIONS - 4		MISSING OBSERVATIONS - 3		

VARIABLE GEW11				
MEAN	21.900	S.E. MEAN	.	STD DEV .
VARIANCE	.	KURTOSIS	.	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE .000
MINIMUM	21.900	MAXIMUM	21.900	SUM 21.900
VALID OBSERVATIONS - 1		MISSING OBSERVATIONS - 6		

VARIABLE GEW12				
MEAN	23.400	S.E. MEAN	.	STD DEV .
VARIANCE	.	KURTOSIS	.	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE .000
MINIMUM	23.400	MAXIMUM	23.400	SUM 23.400
VALID OBSERVATIONS - 1		MISSING OBSERVATIONS - 6		

VARIABLE GEW13				
MEAN	24.800	S.E. MEAN	.	STD DEV .
VARIANCE	.	KURTOSIS	.	S.E. KURT .
SKEWNESS	.	S.E. SKEW	.	RANGE .000
MINIMUM	24.800	MAXIMUM	24.800	SUM 24.800
VALID OBSERVATIONS - 1		MISSING OBSERVATIONS - 6		

VARIABLE GEW14
 STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
 VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.

MAUSGRP: 26

VARIABLE GEW1		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	6.267		.387		.948
VARIANCE	.899		KURTOSIS	-.043	S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	-.434		S.E. SKEW	.845	RANGE 2.700
MINIMUM	4.800		MAXIMUM	7.500	SUM 37.600
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW2		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	10.071		1.112		2.943
VARIANCE	8.659		KURTOSIS	-1.253	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.241		S.E. SKEW	.794	RANGE 8.000
MINIMUM	6.000		MAXIMUM	14.000	SUM 70.500
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW3		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	12.414		1.360		3.597
VARIANCE	12.941		KURTOSIS	-1.365	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.130		S.E. SKEW	.794	RANGE 9.400
MINIMUM	7.600		MAXIMUM	17.000	SUM 86.900
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW4		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	14.043		1.526		4.037
VARIANCE	16.300		KURTOSIS	-1.302	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	-.003		S.E. SKEW	.794	RANGE 10.600
MINIMUM	8.700		MAXIMUM	19.300	SUM 98.300
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW5		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	16.586		1.698		4.493
VARIANCE	20.185		KURTOSIS	-1.100	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.200		S.E. SKEW	.794	RANGE 12.200
MINIMUM	10.800		MAXIMUM	23.000	SUM 116.100
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW6		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	18.700		1.857		4.914
VARIANCE	24.143		KURTOSIS	-.379	S.E. KURT 2.000
SKEWNESS	.541		S.E. SKEW	.794	RANGE 14.100
MINIMUM	12.600		MAXIMUM	26.700	SUM 130.900
VALID OBSERVATIONS - 7		MISSING OBSERVATIONS - 0			

VARIABLE GEW7		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	19.000		1.495		3.663
VARIANCE	13.416		KURTOSIS	-.013	S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	.428		S.E. SKEW	.845	RANGE 10.300
MINIMUM	14.400		MAXIMUM	24.700	SUM 114.000
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW8		S.E.	MEAN	STD DEV	
MEAN	20.433		1.430		3.503
VARIANCE	12.271		KURTOSIS	.042	S.E. KURT 2.060
SKEWNESS	.451		S.E. SKEW	.845	RANGE 9.900
MINIMUM	16.000		MAXIMUM	25.900	SUM 122.600
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

MAUSGRP: 26

VARIABLE GEW9

MEAN	21.683	S.E. MEAN	1.384	STD DEV	3.390
VARIANCE	11.494	KURTOSIS	.091	S.E. KURT	2.060
SKEWNESS	.482	S.E. SKEW	.845	RANGE	9.600
MINIMUM	17.400	MAXIMUM	27.000	SUM	130.100
VALID OBSERVATIONS - 6		MISSING OBSERVATIONS - 1			

VARIABLE GEW10

MEAN	21.820	S.E. MEAN	1.016	STD DEV	2.272
VARIANCE	5.162	KURTOSIS	-.645	S.E. KURT	2.191
SKEWNESS	-.198	S.E. SKEW	.913	RANGE	5.900
MINIMUM	18.800	MAXIMUM	24.700	SUM	109.100
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW11

MEAN	22.900	S.E. MEAN	.954	STD DEV	2.134
VARIANCE	4.555	KURTOSIS	-.399	S.E. KURT	2.191
SKEWNESS	-.070	S.E. SKEW	.913	RANGE	5.600
MINIMUM	20.100	MAXIMUM	25.700	SUM	114.500
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW12

MEAN	23.960	S.E. MEAN	.890	STD DEV	1.991
VARIANCE	3.963	KURTOSIS	-.488	S.E. KURT	2.191
SKEWNESS	.006	S.E. SKEW	.913	RANGE	5.200
MINIMUM	21.400	MAXIMUM	26.600	SUM	119.800
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW13

MEAN	24.880	S.E. MEAN	.854	STD DEV	1.910
VARIANCE	3.647	KURTOSIS	-.445	S.E. KURT	2.191
SKEWNESS	-.027	S.E. SKEW	.913	RANGE	5.000
MINIMUM	22.400	MAXIMUM	27.400	SUM	124.400
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW14

MEAN	25.820	S.E. MEAN	.793	STD DEV	1.774
VARIANCE	3.147	KURTOSIS	-.685	S.E. KURT	2.191
SKEWNESS	-.113	S.E. SKEW	.913	RANGE	4.600
MINIMUM	23.500	MAXIMUM	28.100	SUM	129.100
VALID OBSERVATIONS - 5		MISSING OBSERVATIONS - 2			

VARIABLE GEW15

STATISTICS CAN NOT BE COMPUTED FOR THIS VARIABLE.
VARIABLE IS MISSING FOR EVERY CASE.

7 LITERATUR

1. ACKERMANN, R., PITTS, J., ROSENTHAL, I.: Reactions of singlet oxygen O_2 with olefins, sulfides and compounds of biological significance. In: Symposium on Oxidation by Singlet Oxygen, Division of Petroleum Chemistry, American Chemical Society. Preprints of Papers, Vol. 16, pp. A25 - A34, (1971).
2. ANDERSON, R.L., et al.: Selection of predictor variables in linear multiple regression. In: Statistical Papers in Honor of George W. Snedecor; University of Iowa Press, Ames, Iowa. (1972).
3. BARKER, D.S., HENDERSON, R.W., STOREY, E.: The in vivo localization of porphyrins. Br. J. Exp. Pathol., 51: 628 - 638, (1970).
4. BASES, R.E., BRODIE, S.S., RUBENFELD, S.: Attempts a tumor localization using Cu^{64} -labeled copper porphyrins. Cancer, 11: 259 - 263, (1958).
5. BENSON, R.C., FARROW, G.M., KINSEY, J.H., CORTESE, D.A.: Detection and localization of in situ carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative. Mayo Clin. Proc., 57: 548 - 555, (1982).
6. BERNS, M.W., WILE, A., DAHLMAN, A., JOHNSON, F., BURNS, R.: Cellular uptake, excretion and localization of hematoporphyrin derivative. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin Photosensitization. New York: Plenum Press, 139 - 150, (1983).
7. BERNS, M.W., COFFEY, J., WILE, A.G.: Laser photoradiation therapy of cancer: Possible role of hyperthermia. Laser in Surgery and Medicine, 4: 87 - 92, (1984).

8. BERNs, M.W., BERNs, G.S., COFFEY, J., WILE, A.G.: Exposure tables for hematoporphyrin derivative photoradiation therapy. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 107 - 131, (1984).
9. BERNs, M.W., RETTENMAIER, M., MC CULLOUGH, J., COFFEY, J., WILE, A., BERMAN, M., DI SAIA, P., WEINSTEIN, G.: Response of psoriasis to red laser light (630 nm) following systemic injection of hematoporphyrin derivative. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 73 - 77, (1984).
10. BODANESS, R.S., CHAN, P.C.: Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxydation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide. *J. Biol. Chem.*, 252: 8554 - 8560, (1977).
11. BOGGAN, J.E., EDWARDS, M., BERNs, M.W., WALTER, R.J., BOLGER, C.A.: Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy of the rat 9L gliosarcoma brain tumor model. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 99 - 105, (1984).
12. BONNET, R., BERENBAUM, M.C.: HpD - a study of its components and their properties. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. *Porphyrin photosensitization*. New York Plenum Press, 241 - 250, (1983).
13. BOONE, M.L., FREEMAN, M.L., ENSLEY, B.A., MEYER, K.R., GILETTE, E.L.: The effect of pH on cell lethality from hyperthermia and irradiation in a mouse mammary tumor-derived cell line. *Abstr. Rad. Res. Soc.*, 74, 527, (1978).
14. BRUCE, R.A.: Evaluation of hematoporphyrin photoradiation therapy to treat choroidal melanomas. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 59 - 64, (1984).
15. BUGELSKI, P.J.: The morphological aspects of the photosensitizing effects and distribution of hematoporphyrin derivative in experimental tumors and cultured cells. Ph. D. Dissertation, State University of New York, Buffalo, N. Y., (1980)

16. BUGELSKI, P.J., PORTER, C.W., DOUGHERTY, T.J.: Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res.*, 4606 - 4610, (1981).
17. CADBY, P.A., DIMITRIADIS, E., GRANT, H.G., WARD, A.D., FORBES, I.: The analysis of hematoporphyrin derivative. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. *Porphyrim photosensitization*. New York: Plenum Press, 251 - 264, (1983).
18. CARPENTER, R.J., RYAN, R.J., NEEL, H.B., SANDERSON, D.R.: Tumor fluorescence with hematoporphyrin derivative. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 85: 661 - 666, (1977).
19. CAUZZO, G., GENNARI, G., JORI, G., SPIKES, J.D.: The effect of chemical structure on the photosensitizing efficiencies of porphyrins. *Photochem. Photobiol.*, 25: 389 - 395, (1977).
20. CHANG, C., DOUGHERTY, T.J.: Photoradiation therapy and thermodynamics of porphyrin uptake and loss in normal and malignant cells in culture. *Abstr. Rad. Res. Soc.*, 74: 498, (1978).
21. CHON, S.N.: Photoradiation therapy in the treatment of malignant brain tumors: A phase I study. *Neurosurg.*, 9: 672 - 678, (1981).
22. CHRISTENSEN, T., MOAN, J., WIBE, E., OTTEBRO, R.: Photodynamic effect of hematoporphyrin throughout the cell cycle of human cell line NHIK 3025 cultivated in vitro. *Br. J. Cancer*, 39: 64 - 68, (1979).
23. CHRISTENSEN, T., MOAN, J.: Photodynamic inactivation of synchronized human cells in vitro in the presence of hematoporphyrin. *Cancer Res.*, 39: 3735 - 3737, (1979).
24. CHRISTENSEN, T., MOAN, J., MC GHEE, J.B., WAKSVIK, H., STIGUM, H.: Studies of HpD: Chemical composition and in vitro photosensi-

- tization. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 151 - 165, (1983).
25. COFFEY, J.H., WILE, A.G., MOSIER, M.A., MASON, G.R., BERNS, M.W.: Evaluation of visual acuity during laser photoradiation therapy of cancer. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 65 - 71, (1984).
26. CORTESE, D.A., KINSEY, J.H., WOOLNER, L.B., PAYNE, W.S., SANDERSON, D.R., FONTANA, R.S.: Clinical applications of a new endoscopic technique for detection of in situ bronchial carcinoma. *Mayo Clin. Proc.*, 54: 635 - 641, (1979).
27. CORTESE, D.A., KINSEY, J.H.: Endoscopic management of lung cancer with hematoporphyrin derivative phototherapy. *Mayo Clin. Proc.*, 57: 543 - 547, (1982).
28. COX, G.S., WHITTEN, D.G.: Excited state interactions of protoporphyrin IX and related porphyrins with molecular oxygen in solutions and in organized assemblies. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. New York: Plenum Press, 279 - 293, (1983).
29. DIAMOND, I., MC DONAGH, A.F., WILSON, C.B., GRANELLI, S.G., NIELSON, S., JAENICKE, R.: Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet*, ii:1175 - 1177, (1972).
30. DIEZEL, W., MEFFERT, H., SÖNNICHSEN, N.: Therapie der Psoriasis mit Hämatoporphyrinderivat und Licht. *Dermatol. Monatsschr.*, 166: 793 - 797, (1980).
31. DIXON, W.L. (Hrsg.): BMDP Statistical Software. University of California Press, Berkeley - Los Angeles - London. (1983)
32. DOIRON, D.R., PROFIO, A.F., VINCENT, R.G.: Fluorescence bronchoscopy for detection of lung cancer. *Chest*, 76: 27 - 32, (1979).

33. DORION, D.R., SVAASAND, L.O., PROFIO, A.E.: Light dosimetry in tissue: Application to photoradiation therapy. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 63 - 76, (1983).
34. DOUGHERTY, T.J.: Activated dyes as antitumor agents. J. Natl. Cancer Inst., 52: 1333 - 1336, (1974).
35. DOUGHERTY, T.J., GRINDEY, G.B., FIEL, R. WEISHAUP, K.R., BOYLE, D.G.: Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J. Natl. Cancer Inst., 55: 115 - 121, (1975).
36. DOUGHERTY, T.J., BOYLE, D., WEISHAUP, K.R., GOMER, C., BORCICKY, D., KAUFMAN, J., GOLDFARB, A., GRINDEY, G.: Phototherapy of human tumors. In: Castellani, A. (ed), Research in Photobiology, New York: Plenum Publishing Corp., 435 - 446, (1976).
37. DOUGHERTY, T.J., GOMER, C.G., WEISHAUP, K.R.: Energetics and efficiency of photoinactivation of murine tumor cells containing hematoporphyrin. Cancer Res., 36: 2330 - 2333, (1976).
38. DOUGHERTY, T.J., KAUFMAN, J.F., GOLDFARB, A., WEISHAUP, K.R., BOYLE, D.G., MITTLEMAN, A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res., 38: 2628 - 2635, (1978).
39. DOUGHERTY, T.J., LAWRENCE, G., KAUFMAN, J.F., BOYLE, D., WEISHAUP, K.R., GOLDFARB, A.: Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. J. Natl Cancer Inst., 62: 231 - 237, (1979).
40. DOUGHERTY, T.J.: Hematoporphyrin derivative for detection and treatment of cancer. J. Surg. Oncology, 15: 209 - 210, (1980).
41. DOUGHERTY, T.J.: Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignancies. J. Invest. Dermatol., 77: 122 - 124, (1981).

42. DOUGHERTY, T.J., THOMA, R.E., BOYLE, D.G., WEISHAUP, K.R. :
Interstitial photoradiation therapy for primary solid tumors
in pet cats and dogs. *Cancer Res.*, **41**: 401 - 404, (1981).
43. DOUGHERTY, T.J., WEISHAUP, K.R., BOYLE, D.G.: Photoradiation
therapy of malignant tumors. In: *Principles and Practice of
Oncology*, DeVita, V., Hellman, S., Rosenberg, S., eds. J.B.
Lippincott Publ. Co., New York, (1981).
44. DOUGHERTY, T.J.: Photoradiation therapy (PRT) of malignant tu-
mors. *CRC Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (1983).
45. DOUGHERTY, T.J., BOYLE, D.G., WEISHAUP, K.R., HENDERSON, B.A.,
POTTER, W.R., BELLNIER, D.A., WITYK, K.E.: Photoradiation
therapy - clinical and drug advances. In: Kessel, D., Dougherty
T.J., eds. *Porphyrin photosensitization*. New York: Plenum Press,
3 - 14, (1983).
46. DOUGLASS, H.O., NAVA, H.R., WEISHAUP, K.R., BOYLE, D., SUGER-
MAN, M.G., HALPERN, E., DOUGHERTY, T.J.: Intra-abdominal appli-
cations of hematoporphyrin photoradiation therapy. In: Kessel,
D., Dougherty, T.J., eds. *Porphyrin photosensitization*. New York:
Plenum Press, 15 - 22. (1983).
47. DUBBELMAN, T., GOEIJ, A., VAN STEVENINCK, J.: Photodynamic
effects of protoporphyrin on human erythrocytes. Nature of the
cross-linking of membrane proteins. *Biochem. Biophys. Acta.*,
511: 141 - 151, (1978).
48. DUBBELMAN, T., GOEIJ, A., VAN STEVENINCK, J.: Protoporphyrin -
sensitized photodynamic modification of proteins in isolated
human red blood cell membranes. *Photochem. Photobiol.*, **28**: 197-
204, (1978).

49. DUBBELMAN, T., GOEIJ, A., VAN STEVENINCK, J.: Protoporphyrin - induced photodynamic effects on transport processes across the membrane of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 595 : 133 - 139, (1980).
50. DUMON, J.F., GARBE, L., REBOUD, E., AUCOMTE, F., MERIC, B.: Treatment of tracheobronchial lesions by laser photoresection. *Chest*, 81: 278 - 283, (1982).
51. FIGGE, F.H.J., WEILAND, G.S., MANGANIELLO, L.O.J.: Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68: 640 - 641, (1948).
52. FOOTE, C., CHANG, Y., DENNY, J.: Chemistry of singlet oxygen : X carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.*, 92: 5216 - 5218, (1970).
53. FOOTE, C., DENNY, J., CHANG, Y., PETERS, J.: Quenching of singlet oxygen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 171: 139 - 148, (1970).
54. GERNER, E.W., CONNER, W.G., BOONE, M., DOSS, D., MEYER, E., MILLER, R.: The potential of localized heating as an adjunct to radiation therapy. *Radiology*, 116: 433 - 439, (1975).
55. GILLETTE, E.L., ENSLEY, B.A.: Response of C3H mouse mammary tumor and skin to simultaneous heat and irradiation. *Abstr. Rad. Res. Soc.*, 74, (1978).
56. GIROTTI, A.W.: Photodynamic action of protoporphyrin IX on human erythrocytes: cross-linking of membrane proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72: 1367 - 1374, (1976).
57. GIROTTI, A.W.: Protoporphyrin-sensitized photodamage in isolated membranes of human erythrocytes. *Biochemistry*, 18: 4403-4411, (1979).

58. GIROTTI, A.W., DEZIEL, M.R.: Photodynamic action of protoporphyrin on resealed erythrocyte membranes: Mechanism of release of trapped markers. In Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 213 - 226, (1983).
59. GOLLNICK, K., FRANKEN, T., SCHADE, G., DORHOFFER, G.: Photo-sensitized oxygenation as a function of the triplet energy of sensitizers. Ann. N. Y. Acad. Sci., 171: 89 - 105, (1970).
60. GOMER, C.J., WEISHAUP, K.R., DOUGHERTY, T.J.: The effects of hematoporphyrin derivative and visible red light on V-79 cells. Radiat. Res., 74: 586, (1978).
61. GOMER, C.J., DOUGHERTY, T.J.: Determination of (3 H) -and (14 C) hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. Cancer Res., 39: 146 - 151, (1979).
62. GOMER, C.J., SMITH, D.M.: Photoinactivation of chinese hamster cells by hematoporphyrin derivative and red light. Photochem. Photobiol., 32: 341 - 348, (1980).
63. GOMER, C.J., SZIRTH, B.C., DORION, D.R., JESTER, J.V., LIGUA, R. W., MARK, C., BENEDICT, W.F., MURPHREE, A.L.: Preclinical evaluation of hematoporphyrin derivative for the treatment of intraocular tumors: A preliminary report. In. Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 109 - 114, (1983).
64. GRANELLI, S., DIAMOND, I., MC DONOUGH, A., WILSON, C., NIELSON, S.: Photochemotherapy of glioma cells by visible light and hematoporphyrin. Cancer Res., 35: 2567 - 2570, (1975).
65. GREGORIE, H.B., HORGER, E.O., WARD, J.I., GREEN, J.F., RICHARDS, T., ROBERTSON, H.C., STEVENSON, T.B.: Hematoporphyrin-derivative

- fluorescence in malignant neoplasm. *Ann. Surg.*, 167: 820 - 828, (1968).
66. GUTTER, B., SPECK, W.T., ROSENKRANZ, H.S.: The photodynamic modification of DNA by hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta.*, 475: 307 - 314, (1977).
67. HAHN, G.M.: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.*, 39: 2264 - 2268, (1979).
68. HAINA, D., LANDTHALER, M., BRAUN-FALCO, O., WAIDELICH, W.: Optische Eigenschaften menschlicher Haut. *Optoelektronik in der Medizin*; Hrsg. W.Waidelich. Springer Verlag, 187 - 193, (1984).
69. HARIHARAN, P.V., COURTNEY, J. BLECZKO, S.: Production of hydroxyl radicals in cell systems exposed to hematoporphyrin and red light. *Int. J. Radiat. Biol.*, 37: 691 - 694, (1980).
70. HAUSMANN, W.: *Biochem. Z.*, 30: 276, (1911).
71. HAYATA, Y.: Basic and clinical studies on the diagnosis and treatment of lung cancer using hematoporphyrin derivative and laser photoirradiation. *Proceedings of the Second World Conference on Lung Cancer. Copenhagen, June 1980.*
72. HAYATA, Y., KATO, H., KONAKA, C., ONO, J., TAKIZAWA, N.: Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest*, 81: 269 - 277, (1982).
73. HAYATA, Y., KATO, H., KONAKA, C., ONO, J., AMENIYA, R., KINOSHITA, K., SAKAI, H., YAMADA, R.: Hematoporphyrin derivative and photoradiation therapy in early stage lungcancer. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 39 - 47, (1984).
74. HENDERSON, B.W., BELLNIER, D.A., ZIRING, B., DOUGHERTY, T.J. :

- Aspects of the cellular uptake and retention of hematoporphyrin derivative and their correlation with the biological response to PRT in vitro. In: Kessel, D., Dougherty T.J., eds. Porphyrin photosensitization. NewYork: Plenum Press, 129-138, (1983).
75. JANSEN, W., HAVEMAN, J., VAN DER SCHUEREN, e., BREUR, K., : Comparison of the relative effectiveness of hyperthermia and radiation in vivo and in vitro. Abstr. Rad. Res. Soc.,74,(1978).
76. JOCHAM, D., LÖHRS, U., HAMMER, C., STAEHLER, G., CHAUSSY, CH.: Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) - photosensibilisierende Substanz zur laservermittelten Frühdiagnose und Therapie von Tumoren. Urologische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.
77. JOCHAM, D., STAEHLER, G., CHAUSSY, CH., HAMMER, C., LÖHRS, U.: Laserbehandlung von Blasentumoren nach Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin-Derivat. Urologe A, 20: 340, (1981).
78. JOCHAM, D., HAMMER, C., LÖHRS, U., STAEHLER, G., CHAUSSY, CH.: Farblasertherapie photosensibilisierter Blasentumoren. Chirurg. Forum '82 für experim. und klinische Forschung, Hrsg. S.Weller, Springer Verlag, (1982).
79. JODBAUER, A., VON TAPPEINER, H.: Die Beteiligung des Sauerstoffs bei der Wirkung Fluoreszierender Stoffe. Dtsch. Arch. Klin. Med., 82: 520 - 546, (1905).
80. JORI, G., REDDI, G., TOMIGO, E., SALVATO, B., ZORAT, P., CAL - ZAVARA, F.: Time dependance of hematoporphyrin distribution in selected tissues of normal and in ascites hepatoma. Tumori, 65: 425 - 434, (1979).

81. JORI, G., REDDI, E., TOMIGO, E., CALZAVARA, F.: Factors governing the mechanism and efficiency of porphyrin-sensitized photooxygenation in homogeneous solutions and organized media. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 193 - 212, (1983).
82. KATO, H., KONAKA, C., ONO, J., MATSUSHIMA, Y., NISHIMIYA, K., LAY, J., SAWA, H., SHINOHARA, H., SAITO, T., KINOSHITA, K., TOMONO, T., AIDA, M., HAYATA, Y.: Effectiveness of HpD and radiation therapy in lung cancer. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 23 - 40, (1983).
83. KATO, H., KONAKA, C., ONO, J., HAYATA, Y.: Clinical measurement of tumor fluorescence using a new diagnostic system with hematoporphyrin derivative, laser photoradiation, and a spectroscope. *Laser and Surgery in Medicine*, 4: 49 - 58, (1984).
84. KELLY, J., SNELL, M., BERENBAUM, M.: Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Brit. J. Cancer*, 31: 237 - 244, (1975).
85. KELLY, J., SNELL, M.: Hematoporphyrin-derivative: A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.* 115: 150 -151, (1976).
86. KENNEDY, J.: HpD photoradiation therapy for cancer at Kingston and Hamilton. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 53 - 62, (1983).
87. KESSEL, D.: Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L 1210 cells. *Biochemistry*, 16: 3443 - 3448, (1977).
88. KESSEL, D.: Effects of photo-activated porphyrins in cell surface properties. *Biochem. Soc. Trans.*, 5: 139 - 140, (1977).

89. KESSEL, D.: Transport and binding of hematoporphyrin derivative and related porphyrins by murine leukemia L 1210 cells. *Cancer Res.*, 41: 1318 - 1323, (1981).
90. KESSEL, D., CHOU, T.H.: Porphyrin localizing phenomena. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. *Porphyrin photosensitization*. New York: Plenum Press, 115 - 128, (1983).
91. KINSEY, J.H., CORTESE, D.A., SANDERSON, D.R.: Detection of hematoporphyrin fluorescence during fiberoptic bronchoscopy to localize early bronchogenic carcinoma. *Mayo Clinic Proc.*, 53: 594 - 600, (1978).
92. KINSEY, J.H., CORTESE, D.A.: Endoscopic system for simultaneous visual examination and electron detection of fluorescence. *Rev. Sci. Instrum.*, 51: 1403 - 1406, (1980).
93. KINSEY, J.H., CORTESE, D.A., MOSES, H.L., BRANUM, E.L., RYAN, R.: Photodynamic effect of hematoporphyrin-derivative as a function of optical spectrum and incident energy density. *Cancer Res.*, 41: 5020 - 5026, (1981).
94. KOHN, K., KESSEL, D.: On the mode of cytotoxic action of photoactivated porphyrins. *Biochem. Pharmacol.*, 28: 2465 - 2470, (1979).
95. LEONARD, J.R., BECK, W.L.: Hematoporphyrin fluorescence. An aid in diagnosis of malignant neoplasms. *Laryngoscope*, 81: 365 - 372, (1971).
96. LI, J.H., CHEN, Y.P., ZHAO, S.D., ZHANG, L.T., SONG, S.Z.: Application of hematoporphyrin derivative and laser-induced photodynamical reaction in the treatment of lung cancer. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 31 - 37, (1984).

97. LIPSON, R.L., BALDES, E.J.: The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch. Dermatol., 82:508-516, (1960).
98. LIPSON, R.L., BALDES, E.J., OLSEN, A.M.: The use of derivative of hematoporphyrin in tumor detection. J. Natl. Cancer Inst., 26: 1 - 8, (1961).
99. LIPSON, R.L., BALDES, E.J., OLSEN, A.M.: A further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for endoscopic detection of malignant disease. Dis Chest, 46: 676 - 679, (1964).
100. LIPSON, R.L., PRATT, J.H., BALDES, E.J., DOCKERTY, M.B.: Hematoporphyrin derivative for the detection of cervical cancer. Obstet. Gynecol., 24: 78 - 84, (1964).
101. LIPSON, R.L., BALDES, E.J., GRAY, M.J.: Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Cancer, 20: 2255 - 2257, (1967).
102. LIPSON, R.L., BALDES, E.J., OLSEN, A.M.: Hematoporphyrin derivative: A new aid for endoscopic detection of malignant disease. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 42: 623 - 629, (1981).
103. MARIHARAN, P.V., COURTNEY, J., BLECKZO, S.: Production of hydroxyl radicals in cell systems exposed to hematoporphyrin and red light. Int. J. Radiat. Biol., 37: 691 - 694, (1980).
104. MATHESON, I., ETHERIDGE, R., KRATOWICH, N., LEE, J.: The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. Photochem. Photobiol., 21: 165 - 171, (1975).
105. MC PHEE, M.S., THORNDYKE, C.W., THOMAS, G., TULIP, J., CHAPMAN,:

- Interstitial application of laser irradiation in hematoporphyrin derivative-photosensitized Dunning R 3327 prostate cancers. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 93 - 98, (1984).
106. MEYER-BETZ, F.: Untersuchung über die biologische Wirkung des Hämatoporphyrins. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 112: 476, (1913).
107. MOAN, J., PETERSEN, E.O., CHRISTENSEN, T.: The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of hematoporphyrin. *Br. J. Cancer*, 39: 398 - 407, (1979).
108. MOAN, J., SMEDSHAMMER, L., CHRISTENSEN, T.: Photodynamic effects of human cells exposed to light in the presence of hematoporphyrin, pH effects. *Cancer Lett.*, 9: 327 - 332, (1980).
109. MOAN, J., SANDBERG, T., CHRISTENSEN, T., ELANDER, S.: Hematoporphyrins derivative. Chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. In: Kessel, D, Dougherty, T.J., eds. *Porphyrin Photosensitization*. New York: Plenum Press, 165 - 180, (1983).
110. MOSSMAN, B.T., GRAY, M.J., SILBERMAN, L., LIPSON, R.L.: Identification of neoplastic versus normal cells in human cervical cell culture. *Obstet. Gynecol.*, 43: 635 - 639, (1974).
111. MUNSON, B.R., FIEL, R.J.: Hematoporphyrin-sensitized photodynamic inactivation of viral RNA-dependent RNA polymerase. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 16: 175 - 178, (1977).
112. MUSSER, D.A., DATTA-GUPTA, N., FIEL, R.J.: Inhibition DNA dependent RNA synthesis by porphyrin photosensitizers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97: 918 - 925, (1980).
113. OTTE, J., MANZ, R., THEWS, G., VAUPEL, P.: Impact of localized hyperthermia on the oxygenation status of malignant tumors. Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft, Va.57/2-1, (1982).

114. OVERGAARD, J.: Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. *Cancer*, 39: 2637 - 2646, (1977).
115. PARRISH, J.A.: Photobiologic considerations in photoradiation therapy. In: Kessel; D., Dougherty, T.J., eds. *Porphyrin photosensitization*. New York: Plenum Press, 91 - 108, (1983).
116. PATRICE, T., LE BODIC, M.F., LE BODIC, L.L., SPREUX, T., DABOUIS, G., HERVOUET, L.: Neodymium-yttrium aluminium garnet laser destruction of nonsensitized and hematoporphyrin derivative-sensitized tumors. *Cancer Res.*, 43: 2876 - 2879, (1983).
117. PROFIO, A.E., DORION, D.R.: A feasibility study of the use of fluorescence bronchoscopy for localization of small lung tumors. *Phys. Med. Biol.*, 22: 949 - 957, (1977).
118. RAAB, O.: Über die Wirkung Fluorescierender Stoffe auf Infusorieria. *J. Biol.*, 39: 524, (1900).
119. RASMUSSEN-TAXDAL, D.S., WARD, G.E., FIGGE, F.H.: Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer*, 8: 78 - 81, (1955).
120. RAYMOND, U., NOELL, T.K., LOWELL, S., MILLER, S., WOODWARD, K., WORDE, T.: Microwave energy induced localized hyperthermia and radiotherapy of malignant tumors. *Abstr. Rad. Res. Soc.*, 74: 528, (1978).
121. ROCHESE, F.: The fluorescence of cancer under the Wood Light. *Oral. Surg., Oral. Med., Oral. Path.*, 7: 967, (1954).
122. SANDERSON, D.R., FONTANA, R.S., LIPSON, R.L., et al.: Hematoporphyrin as a diagnostic tool. *Cancer*, 30: 1368 - 1372, (1972).

123. SCHWARTZ, S., ABSOLON, K., VERMUND, H.: Univ. Minnesota Med. Bull., 27: 7, (1955).
124. SERY, T.W.: Photodynamic killing of retinoblastoma cells with hematoporphyrin and light. Cancer Res., 39: 96 - 100, (1979).
125. SIGNORELLI, C.D., AMMIRATI, M., TAJANA, G.: Photochemotherapy of human glioma cells in culture by hematoporphyrin and visible light. Acta. Neurolog. (Naples), 33: 105 - 112, (1978).
126. SILVER, H.: Psoriasis vulgaris treated with hematoporphyrin. Arch. Dermatol. Syphilol., 36: 1118 - 1119, (1937).
127. SONG, C.W., RHEE, J.W., PATTEN, M.: Effect of hyperthermia and X-irradiation on blood flow in tumors and normal tissue. Abstr. Rad. Res. Soc., 74: 526, (1978).
128. SPIKES, J.D.: A preliminary comparison of the photosensitizing properties of porphyrins in aqueous solution and liposomal systems. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 181 - 192, (1983).
129. STAHLER, G., JOCHAM, D., UNSÖLD, E., CHAUSSY, CH.: Grundlagen der Diagnose und Therapie von Blasentumoren nach Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin-Derivat (HpD). Urologische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.
130. STEVENINCK, VAN, J., DUBBELMAN, T.M., VERWEIJ, H.: Photodynamic membrane damage. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 227 - 240, (1983).
131. SVAASAND, L.O., DORION, D.R., DOUGHERTY, T.J.: Temperature rise during photoradiation therapy of malignant tumors. Med. Phys., 10: 7 - 10, (1983).

132. SVAASAND, L.O., DORION, D.R.: Thermal distribution during photo-radiation therapy. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 77 - 90, (1983).
133. TAPPEINER, VON, H.: Ueber die Wirkung fluorescierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. Muench. Med. Wochenschr., 1: 5 - 7, (1900).
134. TAPPEINER, VON, H., JESIONEK, A.: Therapeutische Versuche mit fluorescierenden Stoffen. Muench. Med. Wochenschr., 1: 2042 - 2044, (1903).
135. THALLER, R.A., LYSTER, D.M., DOLPHIN, D.: Potential use of radialabelled porphyrins for tumor scanning. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 265 - 278, (1983).
136. TIPPING, E., KETERER, B., KOSKEIO, P.: The binding of porphyrin by ligandin. Biochem. J., 169: 509 - 516, (1978).
137. TOMIO, L., REDDI, E., JORI, G., ZORAL, P.L., PIZZI, G.B., CALZAVARA, F.: Hematoporphyrin as a sensitizer in tumor phototherapy: effect of medium polarity on the photosensitizing efficiency and role of the administration pathway on the distribution in normal and tumor-bearing rats. Springer Ser. Opt. Sci., 22: 76 - 82, (1980).
138. TORINUKI, W., MIURA, T., SEIJ, M.: Lysosome destruction and lipoperoxide formation due to active oxygen generated from hematoporphyrin and UV irradiation. Br. J. Dermatol., 102:17-27, (1980).
139. VINCENT, R.G., DOUGHERTY, T.J., RAO, U., DORION, D.R.: Hemato-

- porphyrin derivative in the diagnosis and treatment of lung cancer. In: Kessel D., Dougherty, T.J., eds. porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 41 - 46, (1983).
140. VINCENT, R.G., DOUGHERTY, T.J., RAO, U., BOYLE, D.G., POTTER, W.R.: Photoradiation therapy in advanced carcinoma of the trachea and bronchus. *Chest*, 85/1: 29 - 32, (1984).
141. WALDOW, S.M., DOUGHERTY, T.J.: Interaction of hyperthermia and photoradiation therapy. *Radiat. Res.*, 97: 380 - 385, (1984).
142. WALDOW, S.M., HENDRESON, B.W., DOUGHERTY, T.J.: Enhanced tumor control following sequential treatments of photodynamic therapy (PDT) and localized microwave hyperthermia in vivo. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 79 - 85, (1984).
143. WEHWECK, H.: Autoradiographische Untersuchungen zum Proliferationsverhalten gynäkologischer Karzinome. Inaugural-Dissertation aus dem Strahlenbiologischen Institut der Universität München, (1981).
144. WEISHAUP, K.R., GOMER, C.J., DOUGHERTY, T.J.: Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoactivation of a murine tumor. *Cancer Res.*, 36: 2326 - 2329, (1976).
145. WEISHAUP, K.R., DOUGHERTY, T.J.: Photoradiation therapy: Optimum wave length for in vivo activation of hematoporphyrin derivative with laser irradiation. *Radiat. Res.*, 74: 586 , (1978).
146. WILE, A.G., DAHLMAN, A., BURNS, R.G., BERNIS, M.W.: Laser photoradiation therapy of cancer following hematoporphyrin sensitization. *Laser in Surgery and Medicine*, 2: 163 - 168, (1982).
147. WILE, A.G., DAHLMAN, A., BURNS, R.G., MASON, F.M., JOHNSON, G.R., BERNIS, M.W.: Laser photoradiation therapy or recurrent

- human breast cancer and cancer of the head and neck. In: Kessel, D., Dougherty, T.J., eds. Porphyrin photosensitization. New York: Plenum Press, 47 - 52, (1983).
148. WILE, A.G., COFFEY, J., NAHABEDIAN, M.Y., BAGHDASSARIAN, R., MASON, G.R., BERNS, M.W.: Laser photoradiation therapy of cancer: An update of the experience at the University of California, Irvine. *Laser in Surgery and Medicine*, 4: 5 - 12, (1984).
149. WINKELMAN, J., RASMUSSEN-TAXDALL, D.S.: Quantitative determination of porphyrin uptake by tumor tissue following parenteral administration. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 107: 228 - 233, (1960).
150. WINKELMAN, J.: Intracellular localisation of " hematoporphyrin" in a transplanted tumor. *J. Natl. Cancer Inst.*, 27: 1369 - 1377, (1961).
151. WINKELMAN, J., HAYES, J.E.: Distribution of endogenous and parenterally administered porphyrin in viable and necrotic portions of a transplantable tumor. *Nature*, 200: 903 - 904, (1963).
152. WINKELMAN, J., SLATER, G., GROSSMAN, J.: The concentration in tumor and other tissues of parenterally administered tritium- and ^{14}C -labeled tetraphenylporphinesulfonate. *Cancer Res.*, 27: 2060 - 2064, (1967).
153. ZAR, J.H.: *Biostatistical analysis*. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J., (1974).
154. N.N.: *SPSS^X Users Guide*, Mc Graw-Hill Book Co., New York, (1983).

LEBENS LAUF

- 1953 5. Mai, in Kassel geboren
 Vater : Otto Schröder; Industriekaufmann
 Mutter: Anneliese Schröder, geb. Kaltenbach; Haus-
 frau
- 1960 Einschulung: Volksschule Kassel-Wilhelmshöhe
- 1964 Freie Waldorfschule Kassel, dort
- 1973 Abitur
- 1973 - 74 Krankenpflegehelfer in Kassel
- 1974 Einberufung zur Bundeswehr: Sanitäter
- 1975 Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer: Zivildienst
 im Krankentransport (ASB Kassel)
- 1975 - 77 Krankenpflegehelfer in verschiedenen Kliniken in
 München
- 1977 Humanmedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Uni-
 versität in München
- 1984 III. Ärztliche Prüfung
- 1985 Assistenzarzt in der Frauenklinik Dr. Koschade in
 Dachau

